MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 34 Ano—1939 Fasciculo 2

Febre maculosa *

Identidade imunologica dos virus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas

por

J. Travassos e Emmanuel Dias
Instituto Butantan — São Paulo Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro

(Com 14 gráficos no texto)

Indice Pags.

Introdução 149
Material 150
Próvas de imunidade crusada 151
Próvas de vacinação 162
Próvas de reestimulação antigenica 171
Sumario e discussão 173
Conclusão 178
Bibliografia 178

INTRODUÇÃO

Em 1929 foi reconhecida a existencia, no Brasil, de uma modalidade de rickettsiose que, por sua sintomatologia e alta mortalidade, por seus agentes transmissores (Ixódidas), por seu aspéto epidemiológico e pelo comportamento experimental do virus, filia-se ao grupo da fébre maculósa das Montanhas Rochosas. A doença foi até agora observada nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, sobretudo nas zonas rurais e semi-rurais

* Recebido para publicação a 29 de Agosto de 1938 e dado á publicidade em Julho de 1939.

que circundam as cidades de São Paulo e Bélo Horisonte, tendo sido inicialmente conhecida pelas designações de « tifo exantematico de São Paulo » e « tifo exantematico de Minas Gerais ».

Si bem que pesquisas anteriores já tenham estabelecido a identidade imunológica entre o virus da febre maculosa das Montanhas Rochosas e o de São Paulo, não foi ainda realisado um estudo comparativo aprofundado do virus de Minas Gerais quér com o de São Paulo, quér com o das Montanhas Rochosas, nem o dos tres virus entre si.

Visando assentar definitivamente a relação imunologica entre os virus isolados no Brasil (virus São Paulo e virus Minas Gerais) e o do tipo Oéste das Montanhas Rochosas, procedemos a uma série de próvas cuja descrição e resultados constituem objéto do presente trabalho.

Foram as seguintes as próvas realisadas: 1) próvas de imunidade crusada; 2) próvas de vacinação; 3) próvas de reestimulação antigenica.

MATERIAL

Utilisámo-nos nestas próvas das seguintes amostras de virus: Virus São Paulo — amostras isoladas por um de nós (J. T.) de caso humano de febre maculósa (virus S. P. h.) e de carrapatos naturalmente infectados, da espécie *Amblyomma striatum* (virus S. P. L. XI e S. P. L. II).

Virus Minas Gerais (M. G.) — Amostra de origem humana, isolada em Bélo Horisonte pelo Dr. Otavio de Magalhães; recebemo-la do Dr. R. R. Parker, dos Estados Unidos, em *Dermacentor andersoni* experimentalmente infectados.

Virus Rocky Mountain (R. M.) — Amostra do Oéste de Montana (Bitterroot Valley), recebida igualmente do Dr. Parker em *Dermacentor andersoni* gentilmente remetidos por via aérea.

Todas estas amostras foram conservadas em Butantan por passagens sucessivas em cobaias. Além de quadro anatomo-clinico similhante, todas elas demonstraram grande virulencia para este animal, determinando elevada mortalidade. A que mais patogenica se mostrou foi a amostra de Minas Gerais.

A amostra S. P. h. já contava com mais de 300 passagens em cobaia quando dela nos servimos nestas experiencias, ao passo que as S. P. L. II e S. P. L. XI, originarias de carrapato, haviam sido recentemente isoladas e contavam com pequeno numero de passagens.

Uma amostra de virus Minas Gerais que trouxemos de Bélo Horisonte em cobaias inoculadas por O. Magalhães não pôde ser empregada

nestas experiencias, que já haviam sido iniciadas com a amostra procedente dos Estados Unidos.

Nossas pesquisas foram todas realisadas nos laboratorios da Seção de Virus e Virusterapia do Instituto Butantan.

PROVAS DE IMUNIDADE CRUSADA

Estas prôvas consistiram na reinoculação, após praso suficiente, de cobaias que sobreviveram á infecção por um dos virus (S. P., M. G. e R. M.), com um dos outros dois ou com ambos, sucessivamente. Nessas condições observámos tres séries de animais, correspondentes á inoculação inicial por cada um dos virus. Aproveitando cobaias que resistiram ás prôvas de vacinação, acrecentámos mais duas séries de animais que, tendo sido vacinados e sobrevivido á inoculação de um dos tres virus, foram depois inoculados com outros.

Para facilidade de exposição enumeraremos préviamente as séries de cobaias experimentadas, subdividindo-as e indicando o numero dos graficos em que os protocólos das observações estão resumidos.

Série 1 — Cobaias sobreviventes ao virus São Paulo (S. P.).

(a) S. P. h. { + R. M. + M. G. / + M. G. + R. M. } Grafico 1

(b) S. P. L. II. { + R. M. + M. G. / + M. G. + R. M. } Grafico 2

(c) S. P. L. XI. { + R. M. + M. G. / + M. G. + R. M. } Grafico 3

Série 2 — Cobaias sobreviventes ao virus Minas Gerais (M. G).

M. G. { + R. M. + S. P. / + S. P. + R. M. } Grafico 4

Série 3 — Cobaias sobreviventes ao virus Rocky Mountain (R. M.).

R. M. + M. G. + S. P. Grafico 4

Série 4 — Cobaias vacinadas R. M. e sobreviventes ao virus R. M.

R. M. + M. G. + S. P. Grafico 5

Série 5 — Cobaias vacinadas R M. e sobreviventes ao virus M. G.

M. G. + S. P.
M. G. + R. M. + S. P. Grafico 6

DESCRIÇÃO DAS PROVAS:

Série 1 (a) — Cobaias imunes ao virus S. P. h. (grafico 1):

Das 8 cobaias empregadas nesta série, as tres primeiras (3153, 5139, 5328) sofreram varias inoculações com o virus S. P. antes de serem usadas nas provas de imunidade crusada; as 5 outras foram inoculadas uma só vês com esta amostra e 34 dias após foram provadas com os outros dois virus. Em primeira inoculação heteróloga (segunda inoculação no grafico), 4 receberam o virus M. G. e 4 o virus R. M.

A não ser a cobaia 3153, que morreu 11 dias depois de reinoculada, todas as demais sobreviveram, das quais 6 sem terem apresentado nenhuma elevação térmica e 1 (5940) tendo sofrido alteração febril no 5.º e 9.º dias. Em terceira inoculação, 3 cobaias receberam o virus R. M. e 4 o virus M. G., crusadamente: todas elas sobreviveram a um periodo de observação de 20 dias, 6 sem terem tido a menor reação febril e apenas 1 (5932) tendo apresentado fébre prolongada em seguida á inoculação do virus M. G.

De uma série de cobaias normais usadas como testemunhas dos virus de reinoculação, 6 do virus M. G. e 1 do R. M. morreram de febre maculosa tipica, e 1 do virus R. M. (6255) teve reação febril prolongada e foi sacrificada com sinais tipicos de febre maculosa.

Série 1 (b) — Cobaias imunes ao virus S. P. L. II (grafico 2):

Das 8 cobaias desta série, 5 sofreram segunda inoculação com virus M. G. e 3 com virus R. M. Nenhuma reagiu tipicamente, sobrevivendo todas a 20 dias de observação. Duas cobaias (5298 e 5553) morreram de infecção secundaria após este praso, sem chegarem a ser reinjetadas. Os 6 animais restantes foram posteriormente reinoculados de modo crusado com os virus R. M. e M. G., nenhum deles havendo reagido e sobrevivendo ao periodo de observação de 20 dias.

De 8 cobaias testemunhas, 4 de M. G. e 4 de R. M., todas aparentaram tipica febre maculosa, havendo sobrevivido apenas 1 (6035).

Série 1 (c) — Cobaias imunes ao virus S. P. L. XI (grafico 3):

Oito cobaias imunes a este virus foram reinoculadas, 4 com M. G. e 4 com R. M.: duas delas (5450 e 5470) não mostraram qualquer alteração de temperatura, emquanto que 6 reagiram febrilmente de modo mais ou menos acentuado; afóra a 5381 que morreu de pneumonia intercorrente, as demais sobreviveram, tendo sido submetidas crusadamente á terceira inoculação virulenta. Em 4 delas a observação não pôde ser terminada, por morte devida a pneumonia, mas 3 resistiram por mais de 20 dias sem que tivessem nunca apresentado temperatura acima de 39,6º (cobaias 5385, 5450 e 5473).

Como testemunhas, 3 de M. G. e 3 de R. M., todas tiveram infecção caracteristica, morrendo 5 e sobrevivendo 1 (6035) ao virus R. M.

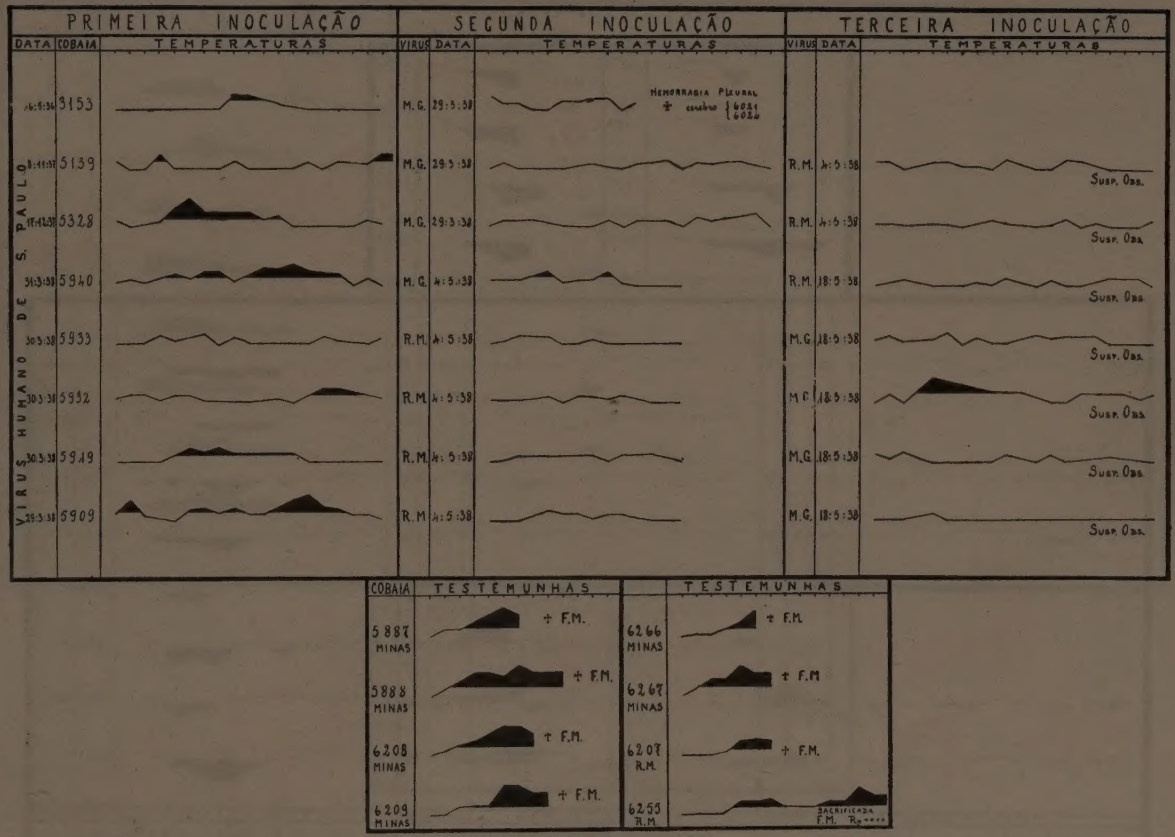

PRIMEIRA INOCULAÇÃO
SEGUNDA INOCULAÇÃO
TERCEIRA INOCULAÇÃO
DATA
COBAIA
VIRUS
TEMPERATURAS
VIRUS HUMANO DE S. PAULO
3153
5139
5328
5940
5933
5932
5949
5909
M. G.
R. M.
HEMORRAGIA PLEURAL
+ cruzes
Susp. Obs.
COBAIA
TESTEMUNHAS
5887 MINAS
5888 MINAS
6208 MINAS
6209 MINAS
6266 MINAS
6267 MINAS
6207 R.M.
6253 R.M.
+ F.M.
SACRIFICADA
F.M.

Grafico 1

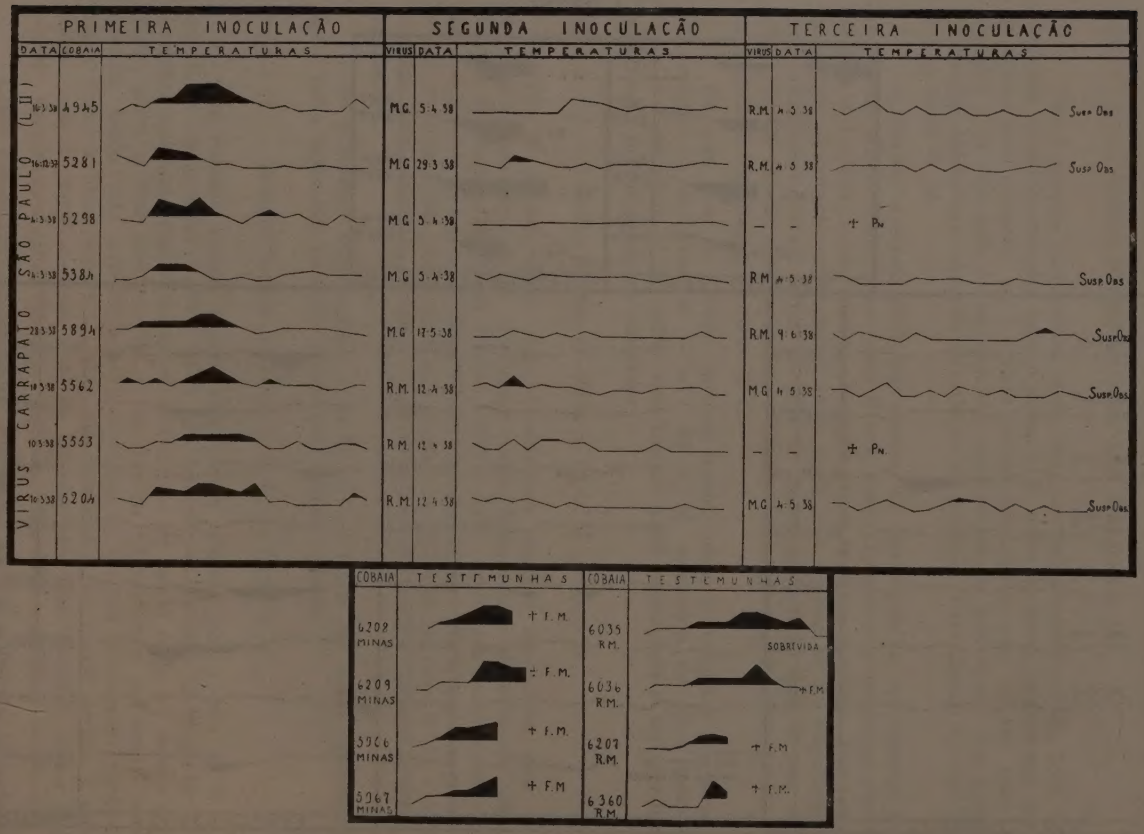

PRIMEIRA INOCULAÇÃO
SEGUNDA INOCULAÇÃO
TERCEIRA INOCULAÇÃO
DATA
COBAIA
TEMPERATURAS
VIRUS
DATA
TEMPERATURAS
VIRUS
DATA
TEMPERATURAS
VIRUS CARRAPATO SÃO PAULO (L II)
16-3-38 A945
16-11-37 5281
4-3-38 5298
24-3-38 5384
28-3-38 5894
19-3-38 5562
10-3-38 5553
10-3-38 5204
M.G 5-4-38
M.G 29-3-38
M.G 5-4-38
M.G 5-4-38
M.G 17-5-38
R.M. 12-4-38
R.M. 12-4-38
R.M. 12-4-38
R.M. 4-5-38 Susp Obs
R.M. 4-5-38 Susp Obs
— — + Pn
R.M 4-5-38 Susp Obs
R.M. 9-6-38 Susp Obs
M.G 4-5-38 Susp Obs
— — + Pn
M.G 4-5-38 Susp Obs
COBAIA
TESTEMUNHAS
6209 MINAS + F.M.
6209 MINAS + F.M.
5966 MINAS + F.M.
5967 MINAS + F.M
COBAIA
TESTEMUNHAS
6035 R.M. SOBREVIDA
6036 R.M. + F.M.
6207 R.M. + F.M
6360 R.M. + F.M.

Grafico 2

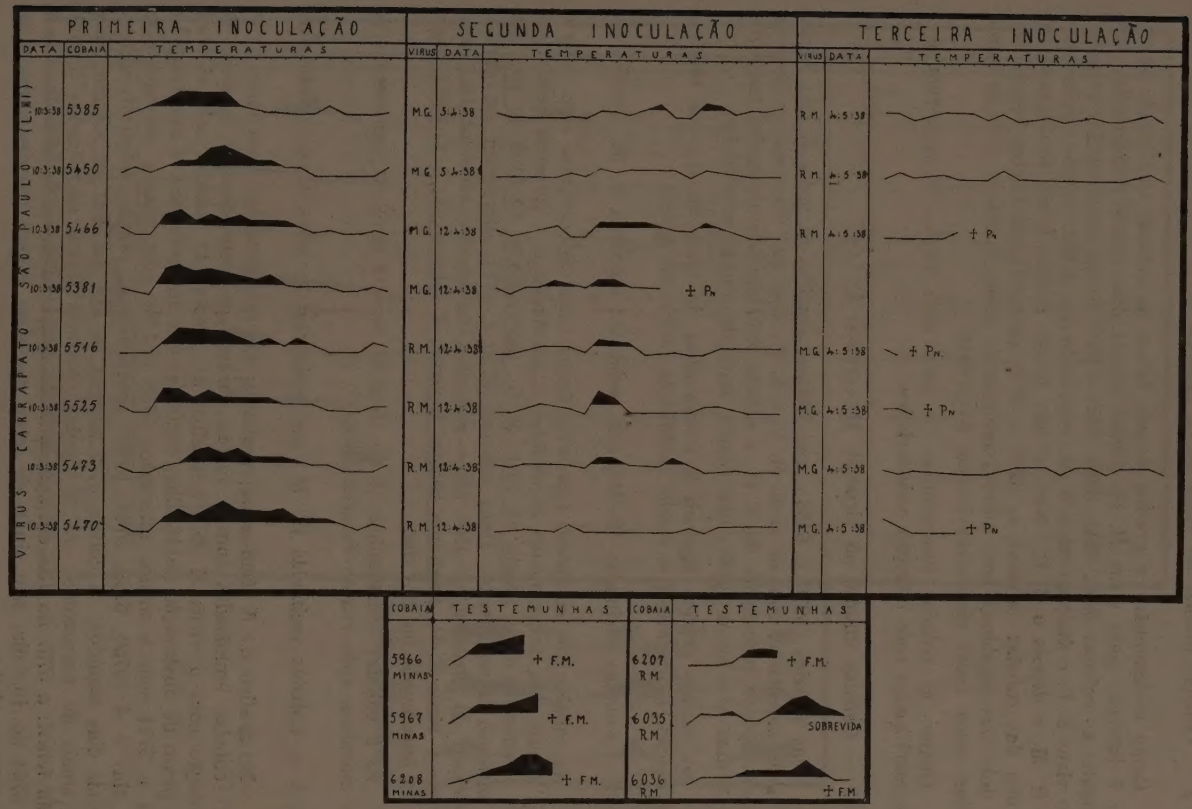

PRIMEIRA INOCULAÇÃO
SEGUNDA INOCULAÇÃO
TERCEIRA INOCULAÇÃO
DATA
COBAIA
TEMPERATURAS
VIRUS
VIRUS CARRAPATO SÃO PAULO (L.81)
10-3-38 5385
10-3-38 5450
10-3-38 5466
10-3-38 5381
10-3-38 5516
10-3-38 5525
10-3-38 5473
10-3-38 5470
M.G. 5-4-38
M.G. 5-4-38
M.G. 12-4-38
M.G. 12-4-38
R.M. 12-4-38
R.M. 12-4-38
R.M. 12-4-38
R.M. 12-4-38
R.M. 4-5-38
R.M. 4-5-38
R.M. 4-5-38
M.G. 4-5-38
M.G. 4-5-38
M.G 4-5-38
M.G. 4-5-38
† PN
† PN
† PN
† PN
† PN
COBAIA
TESTEMUNHAS
5966 MINAS
5967 MINAS
6208 MINAS
† F.M.
† F.M.
† F.M.
6207 RM
6035 RM
6036 RM
† F.M.
SOBREVIDA
† F.M.

Grafico 3

Série 2 — Cobaias imunes ao virus M. G. (grafico 4):

Como o demonstra o grafico 4, seis foram as cobaias que, tendo sobrevivido á infecção pelo virus M. G., foram depois duas vêses reinoculadas crusadamente: as cobaias 6298, 6513, 6284, 6329 e 6354 foram reinoculadas primeiro com o virus S. P. e depois com o R. M., emquanto que a 6021 recebeu primeiro o virus R. M. e depois o S. P. Não só não houve reação febril prolongada em nenhuma das cobaias (apenas as 6298 e 5970 apresentaram ligeira reação durante dois dias seguidos), nem outros sintomas de febre maculosa após as reinoculações, como todas elas sobreviveram ás provas.

Quanto ás cobaias testemunhas (3 para cada virus), 6 morreram e 3 foram sacrificadas com infecção caracteristica.

Série 3 — Cobaias imunes ao virus R. M. (grafico 4):

Duas cobaias (5970 e 6488), que haviam reagido ao virus R. M., foram mais tarde inoculadas com os virus M. G. e S. P., sem que nenhuma reagisse ao primeiro; após a inoculação do S. P., a cobaia 5970 apresentou ligeira febre durante 2 dias e a outra (6488) não reagiu, havendo ambas sobrevivido.

No mesmo grafico figuram 2 testemunhas do virus M. G., que tiveram tipica reação, morrendo 1 e sendo sacrificada outra em agonia.

Série 4 — Cobaias vacinadas (R. M.) que resistiram ao virus R. M. (grafico 5):

As cobaias que compõem esta série foram todas reinoculadas com o virus M. G., tendo sido préviamente submetidas á vacinação e á infecção pelo virus R. M. Nenhuma delas reagiu ao virus M. G., morrendo a n.º 6196 no 13.º dia, com infecção intercorrente. Duas cobaias (5759 e 5773) morreram em seguida ao periodo de observação. Das cinco restantes, novamente reinoculadas, desta vês com o virus S. P., nenhuma reagiu, havendo 4 sobrevivido e 1 (6193) morrido de pneumonia no 10.º dia.

As 9 cobaias testemunhas (5 do virus M. G. e 4 do S. P.) morreram de febre maculosa após reação caracteristica.

Série 5 — Cobaias vacinadas (R. M.) que resistiram ao virus M. G. (grafico 6):

No grafico n.º 6 vêem-se os resultados das reinoculações, com virus S. P., de 11 cobaias imunisadas com a vacina Parker, que sobreviveram á prova de inoculação com o virus M. G. (v. grafico 8). Destas 11 cobaias sobreviveram 8 ao praso de observação de 16 dias; dentre as que sobreviveram, 4 não reagiram (5751 e 5754 sem a menor alteração; 5756 e 5761 com reação passageira no 12.º dia) e 4 (5750, 5753, 5756, 5760) apresentaram reação febril durante 2 ou mais dias seguidos. A cobaia 5762 morreu no 14.º dia sem ter sofrido febre, com sinais de pneumonia. As 2 cobaias restantes foram sacrificadas durante reação febril: a 5757 no 13.º dia apresentando discretas lesões de febre maculosa, e a 5764 no 10.º dia, sem sinais de febre maculosa e com passagens negativas para outras cobaias.

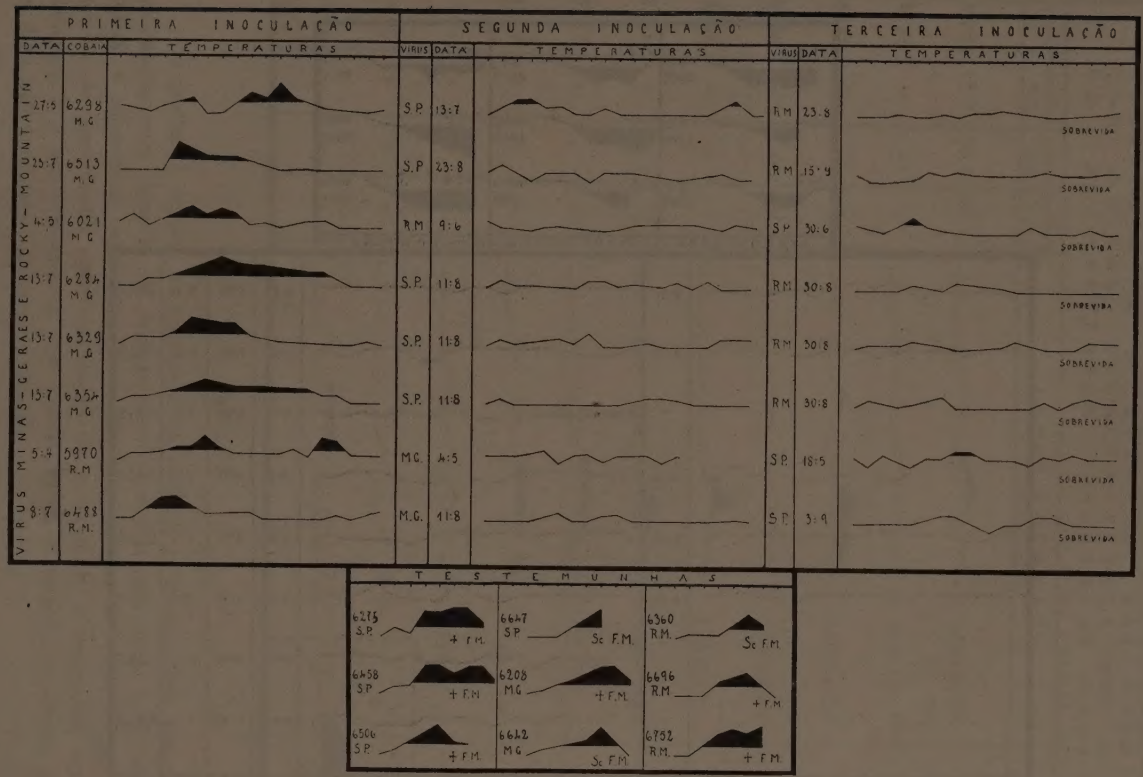

PRIMEIRA INOCULAÇÃO
DATA
COBAIA
TEMPERATURAS
VIRUS MINAS-GERAES E ROCKY-MOUNTAIN
27:5 6238 M.G
25:7 6513 M.G
4:6 6021 M.G
13:7 6284 M.G
13:7 6329 M.G
13:7 6354 M.G
5:7 5970 R.M
8:7 6488 R.M.
SEGUNDA INOCULAÇÃO
VIRUS
DATA
TEMPERATURAS
S.P. 13:7
S.P 23:8
R.M 9:6
S.P. 11:8
S.P. 11:8
S.P. 11:8
M.G. 4:5
M.G. 11:8
TERCEIRA INOCULAÇÃO
VIRUS
DATA
TEMPERATURAS
R.M 23:8
R.M 15:9
S.P 30:6
R.M 30:8
R.M 30:8
R.M 30:8
S.P. 18:5
S.P. 3:9
SOBREVIDA
TESTEMUNHAS
6275 S.P. + F.M.
6647 S.P Sc F.M.
6360 R.M. Sc F.M.
6458 S.P + F.M
6208 M.G + F.M.
6696 R.M + F.M
6506 S.P. + F.M.
6682 M.G Sc F.M.
6782 R.M. + F.M

Grafico 4

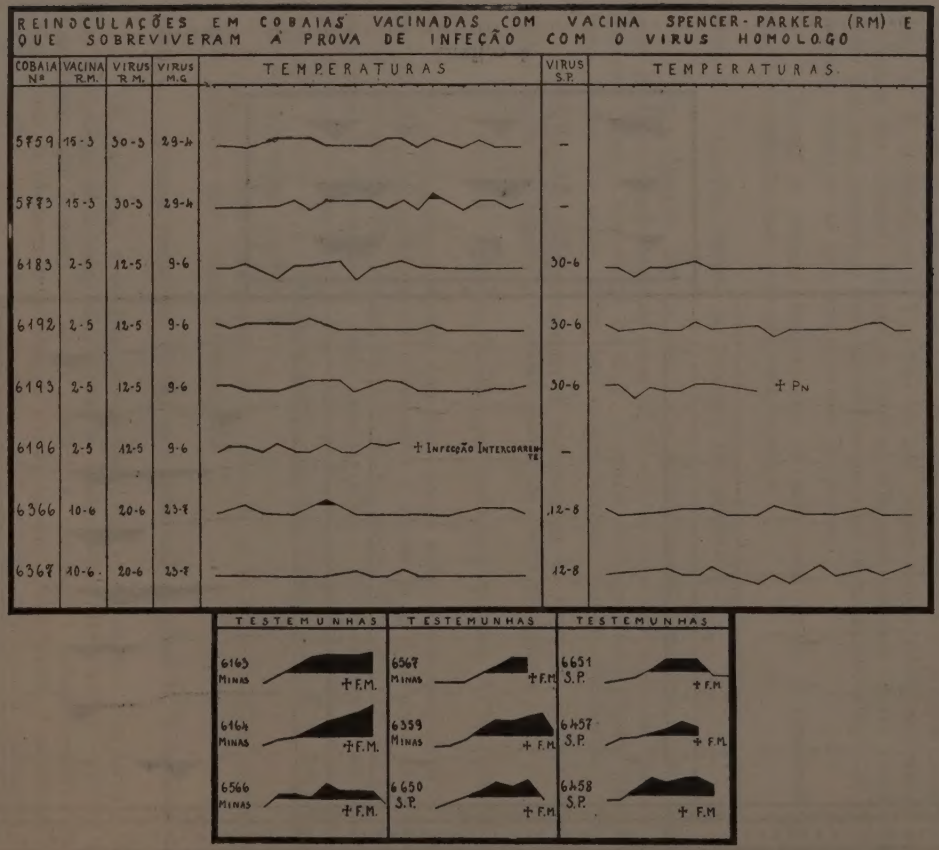

REINOCULAÇÕES EM COBAIAS VACINADAS COM VACINA SPENCER-PARKER (RM) E QUE SOBREVIVERAM Á PROVA DE INFEÇÃO COM O VIRUS HOMOLOGO
COBAIA Nº
VACINA R.M.
VIRUS R.M.
VIRUS M.G.
TEMPERATURAS
VIRUS S.P.
TEMPERATURAS
5759 15-3 30-3 29-4 –
5783 15-3 30-3 29-4 –
6183 2-5 12-5 9-6 30-6
6192 2-5 12-5 9-6 30-6
6193 2-5 12-5 9-6 30-6 † PN
6196 2-5 12-5 9-6 † INFECÇÃO INTERCORRENTE –
6366 10-6 20-6 23-8 12-8
6367 10-6 20-6 23-8 12-8
TESTEMUNHAS
6163 MINAS † F.M.
6164 MINAS † F.M.
6566 MINAS † F.M.
TESTEMUNHAS
6567 MINAS † F.M.
6359 MINAS † F.M.
6650 S.P. † F.M.
TESTEMUNHAS
6651 S.P. † F.M.
6457 S.P. † F.M.
6458 S.P. † F.M

Grafico 5

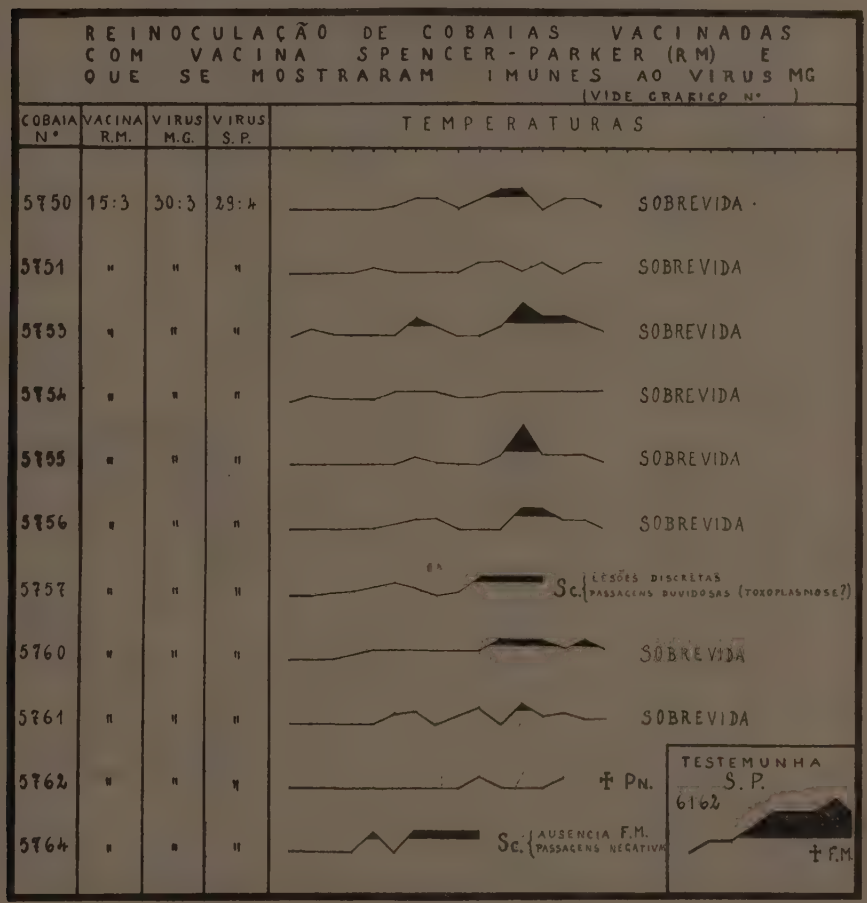


Grafico 6

O grafico 7 resume os protocólos de cobaias da mesma série que foram reinoculadas com virus R. M. primeiramente e depois com virus S. P. Das 5 cobaias, 4 suportaram sem nenhuma reação a inoculação do virus R. M., morrendo 1 de pneumonia; após inoculação do virus S. P. 2 morreram logo de pneumonia e 2 sobreviveram: a 6198 sofreu ligeira e descontinua reação febril e a 6199 não apresentou a menor alteração.

Duas testemunhas do virus S. P. e 1 do R. M. morreram de febre maculosa.

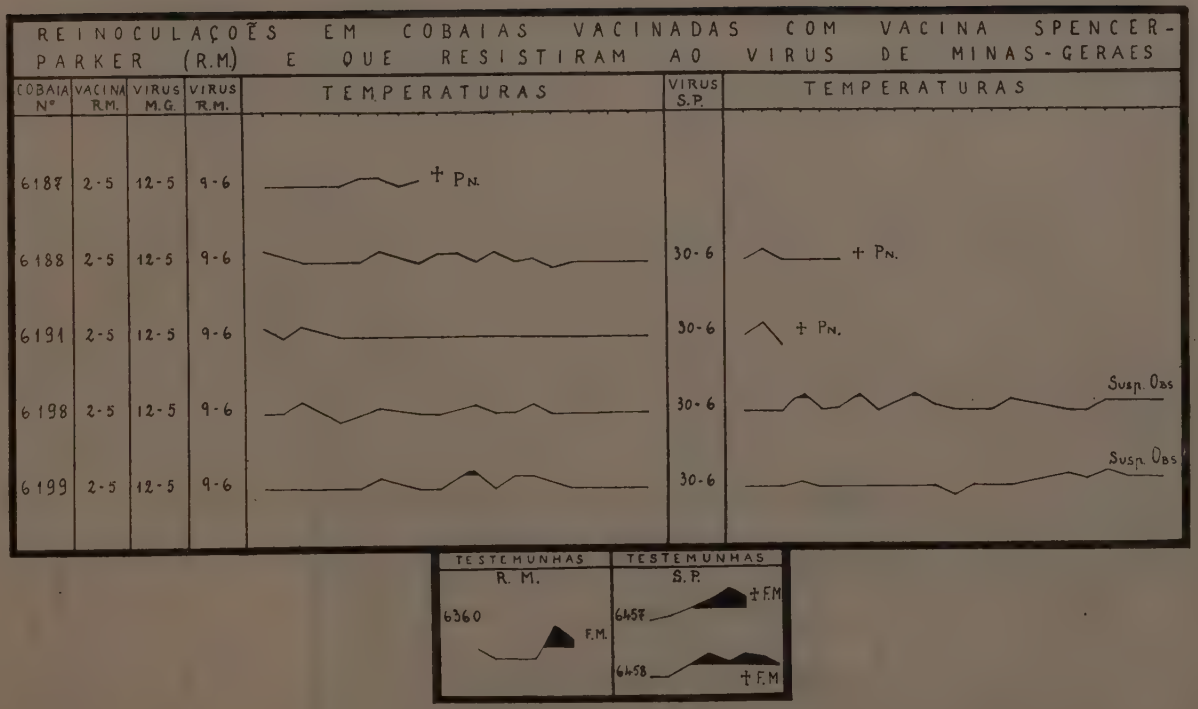

REINOCULAÇÕES EM COBAIAS VACINADAS COM VACINA SPENCER-PARKER (R.M.) E QUE RESISTIRAM AO VIRUS DE MINAS-GERAES
COBAIA Nº
VACINA R.M.
VIRUS M.G.
VIRUS R.M.
TEMPERATURAS
VIRUS S.P.
TEMPERATURAS
6187 2-5 12-5 9-6 † PN.
6188 2-5 12-5 9-6 30-6 † PN.
6191 2-5 12-5 9-6 30-6 † PN.
6198 2-5 12-5 9-6 30-6 Susp. Obs
6199 2-5 12-5 9-6 30-6 Susp. Obs
TESTEMUNHAS R. M.
6360 F.M.
TESTEMUNHAS S.P.
6457 † F.M.
6458 † F.M.

Grafico 7

RESULTADOS DAS PROVAS DE IMUNIDADE CRUSADA

Na realisação das próvas de imunidade crusada cingimo-nos a certas nórmas usualmente recomendadas e observámos condições que convem precisar antes de expôr os resultados.

Tratámos, em primeiro logar, de empregar nelas o maior numero possivel de animais; si as diversas séries foram apesar disto constituidas por poucos, é que com os virus em questão torna-se muito dificil a obtenção de cobaias em condições de próva, dada a infima percentagem das que sobrevivem a uma primeira infecção.

O intervalo entre as inoculações foi variavel. Conviria que na maioria das vêses se tivesse esperado mais alguns dias entre a primeira e segunda inoculação, afim de que medeiasse um intervalo maior entre esta ultima e o termo da defervecencia; um gráo maior de imunidade poderia então provavelmente aparentar o organismo de cobaias ainda não totalmente refeitas.

As inoculações foram sempre praticadas com dóses adequadas e mencionadas de virus-sangue, por via peritoneal, observados sempre os preceitos elementares de assepsía.

A isenção da contaminação bacteriana dos virus foi sempre comprovada durante todo o correr das experiencias. Aliás este contrôle é observado na manutenção rotineira das amostras no nosso laboratorio, sendo realisado sistematicamente para cada passagem.

A observação dos animais de próva, inclusive pela tomada diaria da temperatura retal, prolongou-se quasi sempre pelo praso minimo de 20 dias, mais do que suficiente para semelhantes tests.

Na interpretação dos resultados consideramos sobretudo a análise da curva térmica e os dados de necrópsia. O exame de esfregaço peritoneal dos animais autopsiados foi sempre feito, tendo fornecido indicações variadas e algumas vêses de valôr, principalmente no despistamento de infecções intercorrentes por protosoarios (Toxoplasma) e bacterias, afóra a indicação de presença ou ausencia de rickettsias.

Considerámos « parcialmente imunes » as cobaias que sobreviveram á reinoculação de virus e que apresentaram elevação térmica superior a 39,6° C. por dois ou mais dias consecutivos durante o periodo de observação, e « totalmente imunes » aquelas que nenhuma reação febril sofreram ou que tiveram apenas uma alteração passageira.

No quadro 1 figuram os resultados da observação de cada uma das séries de animais e o de todas elas em conjunto. A análise e interpretação destes resultados é feita na *Discussão* do presente trabalho (pp. 174-176).

Quadro 1

Resultado global das provas de imunidade crusada.

Grafico n.	Primeira inoc. virus	Segunda inoc. virus	N. cobaias	Imun. total	Imun. parcial	Morte		Terceira inoc. virus	N. cobaias	Imun. total	Imun. parcial	Morte		Testemunhas			
						F. M.	Não F. M.					F. M.	Não F. M.	N. cobaias	Virus S. P.	Virus M. G	Virus R. M.
1	S. P.	M. G.	4	3	—	—	1	R. M.	3	3	—	—	—	8	—	6	2
	(h.)	R. M.	4	4	—	—	—	M. G.	4	3	1	—	—				
2	S. P.	M. G.	5	5	—	—	—	R. M.	4	4	—	—	—	8	—	4	4
	(L. 2)	R. M.	3	3	—	—	—	M. G.	2	2	—	—	—				
3	S. P.	M. G	4	1	2	—	1	R. M.	3	2	—	-	1	6	—	3	3
	(L. 11)	R. M.	4	1	3	—	-	M. G.	4	1	—	—	3				
4	M. G.	S. P.	5	4	1	—	—	R. M.	5	5	—	—	—	9	4	2	3
		R. M.	1	1	-	—	—	S. P.	1	1	—	—	-				
4	R. M.	M. G.	2	2	—	—	—	S. P.	2	1	1	-	—				
5	R. M.	M. G.	8	7	—	-	1	S. P.	5	4	—	-	1	9	4	5	—
6	M. G.	S. P.	11	4	5	1	1	—	-	—	—	-	—	1	1	—	—
	M. G.	R. M.	5	4	—	—	1	S. P.	4	1	1	-	2	3	2	-	1
Total			56	39	11	1	5		37	27	3		7	44	11	20	13

PROVAS DE VACINAÇÃO

Nestes ensaios empregámos vacinas fenicadas feitas a partir de carrapatos infectados com cada um dos tres virus, preparadas de acôrdo com a técnica de Spencer e Parker (cf. Dias & Martins 1938). Da vacina R. M. usámos as partidas n.º 5119 e 5527 do Rocky Mountain Laboratory, que nos foram gentilmente enviadas pelo Dr. R. R. Parker; esta vacina é feita com *Dermacentor andersoni* adultos que se infectam durante as fases larvaria e ninfal.

As vacinas M. G. e S. P. foram preparadas por um de nós (J. T.) no Instituto Butantan, com *Amblyomma cajennense* adultos infectados desde larva com os virus respectivos.

Tres séries de animais, correspondentes á imunisação com cada vacina, foram observadas.

Série 1 — Cobaias vacinadas com a vacina Rocky Mountain:

Como o poder protetôr desta vacina contra o virus São Paulo já tivesse sido demonstrado (Monteiro 1933), resolvemos aproveitar as duas partidas disponiveis para verificar em bom numero de animais sua ação contra o virus Minas Gerais, controlando com algumas cobaias a antigenicidade com respeito ao virus homólogo.

(a) — Vacina R. M. + virus M. G. (grafico 8):

Nesta série foram inoculadas ao todo 30 cobaias com a vacina, por via subcutanea: 10 cobaias receberam uma dóse unica de 1 cc.; 4 cobaias tomaram duas dóses de 1 cc.; 12 receberam dóse unica de 2 cc. e 4 cobaias duas dóses de 2 cc. Os animais que tomaram uma só dóse do produto foram 10 e 15 dias mais tarde injetados com o virus-sangue M. G.; os que foram imunisados com duas dóses (com intervalo de 5 dias) receberam o virus 10 dias depois da ultima dóse. O virus (= sangue desfibrinado de cobaia em periodo febril) foi inoculado por via peritoneal nas dóses de 0,2 cc. e 0,5 cc., pouco depois de sangrado no coração o animal doador. A temperatura retal das cobaias foi tomada diariamente em seguida á inoculação de virus.

O grafico n.º 8 resume as condições de experiencia e o resultado da observação dos animais. Do grupo de 10 cobaias vacinadas com uma vez 1 cc., sobreviveram 7, das quais 3 não apresentaram elevação de temperatura acima de 39,6º C. por mais de 2 dias seguidos, e 4 tiveram temperatura superior a esta durante mais de 2 dias consecutivos. Tres cobaias morreram de infecção intercorrente no 9.º (6182) e 15.º dia (5752, 6200), após reação febril, sem mostrarem sinais de febre maculosa.

Das 4 cobaias que receberam duas dóses de 1 cc., duas (5750 e 5751) não reagiram febrilmente ao virus (a 5750 teve febre não significativa durante os dois dias imediatos á inoculação) e duas (5754 e 5755) reagiram entre o 5.º e 10.º dia — mas todas 4 escaparam á ação mortal do virus mineiro. Dentre as 12 cobaias que foram vacinadas com 1 dóse de 2 cc., 7 sobreviveram, das quais sómente 2 apresentaram febre entre o 12.º e 17.º dia (n.º 5762 e 5763), não tendo as outras 5 sofrido reação (6185, 6197, 6190, 6191, 6202); a cobaia 6189 foi sacrificada no 19.º dia, em reação febril tardia, apresentando ligeira esplenomegalia mas resultando negativas as passagens de sangue para cobais normais; a cobaia 6203 morreu no 20.º dia de observação, tendo tido febre do 12.º ao 17.º dia, mostrando á autópsia baço ligeiramente aumentado; 3 animais (6201, 5766, 5767) morreram de infecção intercorrente e sem sinais de febre maculosa. Finalmente, das 4 cobaias injetadas com 2 dóses de 2 cc., sobreviveram tres; a 5760 não teve a menor reação, a 5761 teve uma reação prolongada e a 5764 uma reação irregular; a quarta cobaia (5765) sofreu elevada reação febril tardia, vindo a morrer no 17.º dia com um quadro de autopsia tipico de pneumonia.

Testemunhas — 8 cobaias normais serviram para controle do virus M. G., tendo sido todas inoculadas por via peritoneal, 4 com 0,2 cc. e 4 com 0,5 cc. do virus-sangue utilisado nas provas. Sete morreram entre o 6.º e 10.º dia e uma (5924) foi sacrificada em agonia, tendo todas sofrido intensa reação febril (40-41º) após periodo de incubação médio de 3 dias, apresentando á necrópsia tipicos sinais de febre maculosa.

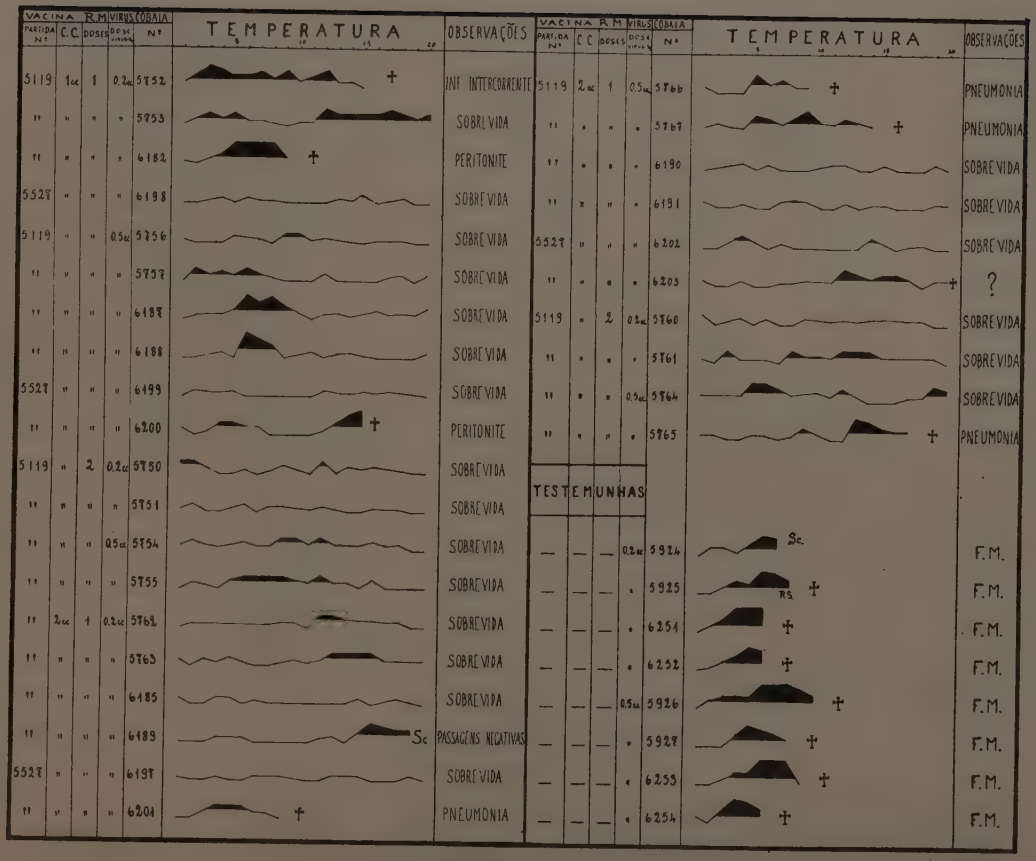

VACINA
PARTIDA Nº
C.C.
R.M. DOSES
VIRUS DOSE VIRULENTA
COBAIA Nº
TEMPERATURA
OBSERVAÇÕES
5119 1cc 1 0.2cc 5752 INF. INTERCORRENTE
" " " " 5753 SOBREVIDA
" " " " 6182 PERITONITE
5527 " " " 6198 SOBREVIDA
5119 " " 0.5cc 5756 SOBREVIDA
" " " " 5757 SOBREVIDA
" " " " 6187 SOBREVIDA
" " " " 6188 SOBREVIDA
5527 " " " 6199 SOBREVIDA
" " " " 6200 PERITONITE
5119 " 2 0.2cc 5750 SOBREVIDA
" " " " 5751 SOBREVIDA
" " " 0.5cc 5754 SOBREVIDA
" " " " 5755 SOBREVIDA
" 2cc 1 0.2cc 5762 SOBREVIDA
" " " " 5763 SOBREVIDA
" " " " 6185 SOBREVIDA
" " " " 6189 Sc PASSAGENS NEGATIVAS
5527 " " " 6197 SOBREVIDA
" " " " 6204 PNEUMONIA
5119 2cc 1 0.5cc 5760 PNEUMONIA
" " " " 5767 PNEUMONIA
" " " " 6190 SOBREVIDA
" " " " 6191 SOBREVIDA
" " " " 6202 SOBREVIDA
" " " " 6203 ?
" " 2 0.2cc 5760 SOBREVIDA
" " " " 5761 SOBREVIDA
" " " 0.5cc 5764 SOBREVIDA
" " " " 5765 PNEUMONIA
TESTEMUNHAS
— — — 0.2cc 5924 Sc F.M.
— — — " 5925 RS F.M.
— — — " 6251 F.M.
— — — " 6252 F.M.
— — — 0.5cc 5926 F.M.
— — — " 5927 F.M.
— — — " 6253 F.M.
— — — " 6254 F.M.

Grafico 8

(b) — Vacina R. M. + virus R. M. (grafico 9):

Nesta série empregámos 8 cobaias, cuja observação foi muito prejudicada pela ocurrencia de infecção secundaria fatal (pneumonia) em 5 delas. E' verdade que dentre estas ultimas, tres (5758, 5769, 5772) resistiram a mais de 12 dias de observação, sendo este o praso de regra adotado no Laboratorio das Montanhas Rochosas para a dosagem das partidas de vacina. As cobaias 5759 e 5773 sobreviveram — a primeira havendo reagido e a segunda não. Finalmente, a cobaia 5771 morreu no 11.º dia, mostrando á autópsia sinais de febre maculosa.

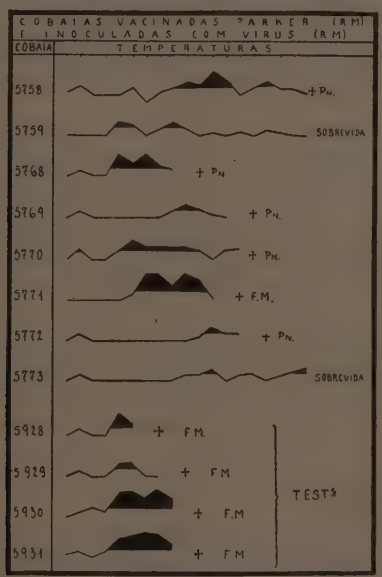


Grafico 9

As 4 cobaias testemunhas desta série morreram em poucos dias, de febre maculosa, em seguida á inoculação do virus R. M.

Série 2 — Cobaias vacinadas com a vacina Minas Gerais (grafico 10):

Com a partida n.º 5 de vacina M. G. injetámos 3 lótes de cobaias com 1 dóse de 1 cc., inoculando 10 e 12 dias depois, por via peritoneal, cada um dos virus.

(a) — Vacina M. G. + virus M. G. (grafico 10):

Da observação de 6 cobaias inoculadas com 0,3 cc. de virus-sangue resultou: 4 sobreviveram (2 reagiram e 2 não reagiram — 6764, 6765, 6767 e

6768); 2 morreram de pneumonia, 13 e 14 dias depois de receberem o virus (6766, 6763).

Tres testemunhas do virus morreram tendo apresentado quadro caracteristico de febre maculosa.

(b) — Vacina M. G. + virus S. P. (grafico 10):

Da série de 6 cobaias resultou: 4 sobreviveram, das quais 2 reagiram e 2 não; 1 (6864) morreu no 10.º dia mostrando á autópsia sinais de pneumonia e de febre maculosa; 1 (6863) morreu de pneumonia ao cabo dos 16 dias de observação, tendo tido varios dias de reação febril.

As duas testemunhas do virus S. P. (0,3 cc.) foram tipicas.

(c) — Vacina M. G. + virus R. M. (grafico 10):

Compoz-se este lóte de 9 cobaias (6 inoculadas com 0,3 cc. de virus e 3 com 0,5). Das 9, sobreviveram 5, das quais 4 sem reagir e 1 tendo reagido fortemente (6760). Uma (6759) morreu logo no inicio, de pneumonia, uma (6758) morreu de febre maculosa, uma (6687) morreu com pneumonia e febre maculosa e a restante (6762) foi sacrificada após intensa reação com sinais de febre maculosa.

Das 5 testemunhas 4 morreram de febre maculosa e 1 foi sacrificada apresentando um quadro tipico da infecção.

Série 3 — Cobaias vacinadas com a vacina São Paulo (grafico 11):

(a) — Vacina S. P. + virus M. G.

Um lóte de 8 cobaias foi empregado nesta série. Seis sobreviveram: as cobaias 6712, 6715 e 6722 não reagiram e as 6713, 6717 e 6723 reagiram febrilmente durante dois ou mais dias; as cobaias 6714 e 6716 foram sacrificadas durante a reação, revelando á necrópsia lesões de febre maculosa.

As testemunhas 6742 e 6741 reagiram e morreram com infecção tipica.

(b) — Vacina S. P. + virus S. P.

De um lóte de 8 animais só sobreviveram 2, que não reagiram. Dos 6 restantes, morreram 4 com sinais de febre maculosa (tres dos quais mostraram tambem lesões tipicas de pneumonia) e dois de pneumonia.

Tres cobaias testemunhas do virus S. P. reagiram tipicamente e morreram de febre maculosa.

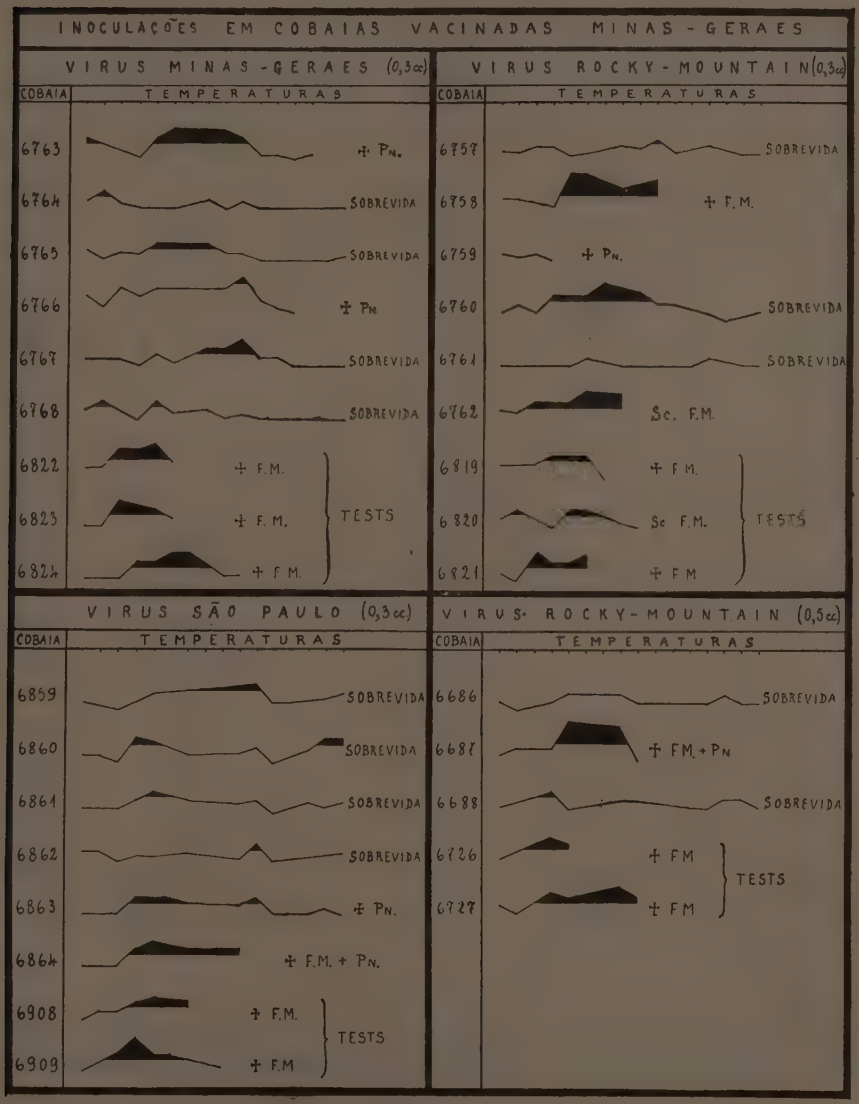

INOCULAÇÕES EM COBAIAS VACINADAS MINAS-GERAES
VIRUS MINAS-GERAES (0,3cc)
COBAIA
TEMPERATURAS
6763
† PN.
6764
SOBREVIDA
6765
SOBREVIDA
6766
† PN
6767
SOBREVIDA
6768
SOBREVIDA
6822
† F.M.
6823
† F.M.
6824
† F.M.
TESTS
VIRUS ROCKY-MOUNTAIN (0,3cc)
COBAIA
TEMPERATURAS
6757
SOBREVIDA
6758
† F.M.
6759
† PN.
6760
SOBREVIDA
6761
SOBREVIDA
6762
Sc. F.M.
6819
† F.M.
6820
Sc F.M.
6821
† F.M
TESTS
VIRUS SÃO PAULO (0,3cc)
COBAIA
TEMPERATURAS
6859
SOBREVIDA
6860
SOBREVIDA
6861
SOBREVIDA
6862
SOBREVIDA
6863
† PN.
6864
† F.M. + PN.
6908
† F.M.
6909
† F.M
TESTS
VIRUS ROCKY-MOUNTAIN (0,5cc)
COBAIA
TEMPERATURAS
6686
SOBREVIDA
6687
† FM. + PN
6688
SOBREVIDA
6726
† FM
6727
† FM
TESTS

Grafico 10

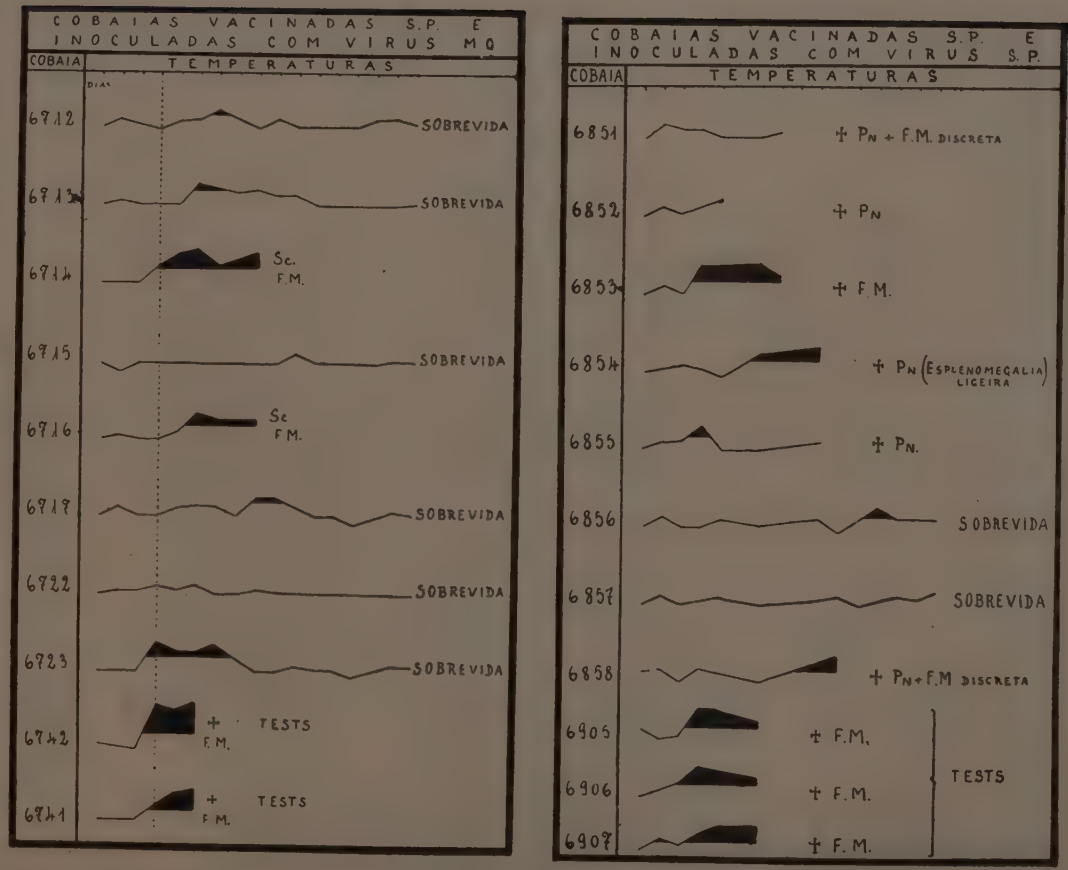

COBAIAS VACINADAS S.P. E INOCULADAS COM VIRUS MQ
COBAIA
TEMPERATURAS
DIAS
6712
SOBREVIDA
6713
SOBREVIDA
6714
Sc.
F.M.
6715
SOBREVIDA
6716
Sc
F.M.
6717
SOBREVIDA
6722
SOBREVIDA
6723
SOBREVIDA
6742
+ TESTS
F.M.
6741
+ TESTS
F.M.
COBAIAS VACINADAS S.P. E INOCULADAS COM VIRUS S.P.
COBAIA
TEMPERATURAS
6851
† PN + F.M. DISCRETA
6852
† PN
6853
† F.M.
6854
† PN (ESPLENOMEGALIA LIGEIRA
6855
† PN.
6856
SOBREVIDA
6857
SOBREVIDA
6858
† PN+F.M DISCRETA
6905
† F.M.
6906
† F.M.
6907
† F.M.
TESTS

Grafico 11

RESULTADOS GLOBAIS DAS PROVAS DE VACINAÇÃO

Na realisação destas experiencias e na observação dos animais nelas empregados observámos as mesmas regras gerais adotadas nas provas de imunidade crusada, com relação ao controle da purêsa dos virus, cuidados de assepsia e interpretação da curva térmica. A temperatura das cobaias foi acompanhada durante 16-20 dias após a inoculação do virus, sendo este praso mais longo do que o geralmente adotado no Laboratorio das Montanhas Rochosas para dosagem das partidas de vacina, que é de 12 dias.

O quadro 2 encerra os resultados globais das diferentes séries de cobaias observadas, cuja interpretação faz parte do capitulo *Discussão* (pp. 176-177).

Quadro 2

Resultado global das provas de vacinação.

Vacina	Virus	N. util cobaias	Sobrevida	Totalmente imunes	Parcialmente imunes	F. M. Morte	F. M. Sacrif.	Cob. sem valor	Test. virus	Grafico n.
R. M.	R. M.	8	3	1	2	1	—	4	4	9
	M. G.	30	22	11	11	1	—	7	8	8
M. G.	M. G.	6	4	2	2	—	—	2	3	
	S. P.	5	4	2	2	—	1	—	2	10
	R. M.	9	5	4	1	2	1	1	5	
S. P.	S. P.	8	2	2	—	4	—	2	3	11
	M. G.	8	6	3	3	—	2	—	2	
Total		74	46	25	21	8	4	16	27	

PROVAS DE VACINAÇÃO DE PARKER

(*Vaccine experiment* 112; graficos 12 e 13)

Antes da impressão do presente trabalho enviamos ao Dr. R. R. Parker, Diretor do Rocky Mountain Laboratory, os graficos que resumem os resultados de nossas provas de imunidade, afim de submete-los á sua autorisada critica. Acompanhando sua resposta e autorisando a publicação no presente trabalho, enviou-nos aquele pesquisador resultados inéditos de experiencias de vacinação que realisara no intuito de verificar o poder protetor da vacina R. M. contra o virus Minas Gerais e Rocky Mountain, comparativamente.

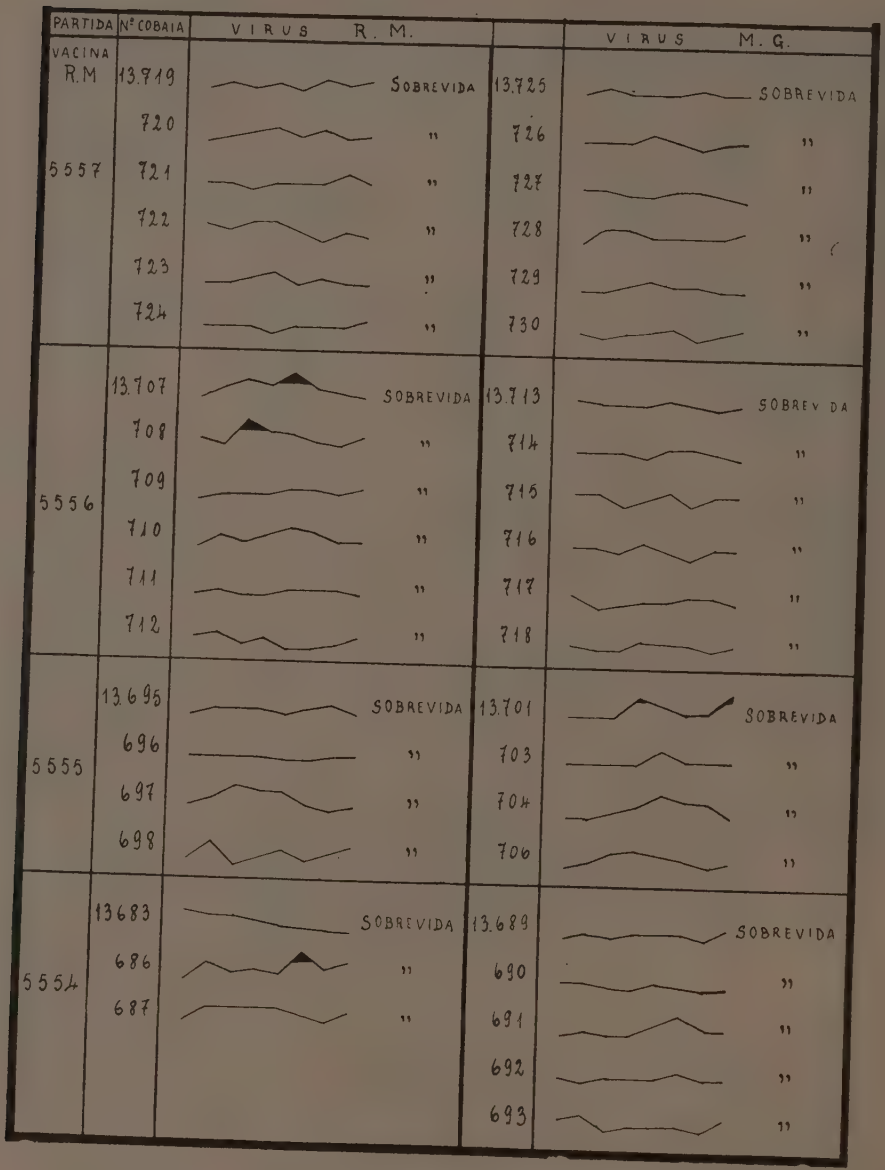

PARTIDA
Nº COBAIA
VIRUS R. M.
VIRUS M. G.
VACINA R.M
5557
5556
5555
5554
13.719
720
721
722
723
724
13.707
708
709
710
711
712
13.695
696
697
698
13683
686
687
13.725
726
727
728
729
730
13.713
714
715
716
717
718
13.701
703
704
706
13.689
690
691
692
693
SOBREVIDA
"
SOBREV DA

Grafico 12

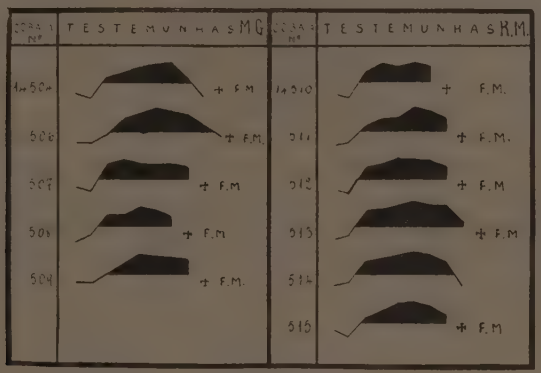


Grafico 13

Nessas experiencias serviu-se de 4 lótes de vacina da melhor potencia, com que inoculou 48 cobaias (12 para cada lóte) com 1 cc. por via subcutanea; 10 dias mais tarde foi feita inoculação de virus-sangue no peritoneo, tendo 24 cobaias recebido o virus R. M. e 24 o virus M. G. O virus M. G. foi o mesmo que empregámos aqui e, segundo Parker, «This strain is more virulent than even the usual Bitter Root Valley strain» (comunicação pessoal).

Os resultados da experiencia 112 estão reunidos no grafico n.º 12, excluidos os resultados inutilisados por infecção intercorrente (*valueless*), mostrando sua análise que: das 24 cobaias provadas com o virus R. M. sobreviveram 19 (16 sem apresentarem a menor reação febril) ao praso de 8 dias de observação, as 5 restantes tendo sido sem valor; e das 24 cobaias do virus M. G., 21 sobreviveram, sem reação, e 3 morreram de causas intercorrentes.

Um lóte de 12 cobaias (grafico 13) foi testemunha dos virus, nas dóses empregadas: das 6 do virus R. M. uma escapou após intensa reação, 5 morreram de F. M.; e das 6 do virus M. G., morreram 5 de febre maculosa e 1 de infecção intercorrente.

PROVAS DE REESTIMULAÇÃO ANTIGENICA EM COELHOS

Em coelhos que sobreviveram ao virus São Paulo após reação febril mais ou menos acentuada, foram feitas posteriormente reinoculações com os virus Rocky Mountain e Minas Gerais.

A primeira inoculação de virus (S. P.) foi feita nas seguintes datas: coelho 176 em 12/11/1937; coelhos 179 e 180, em 14/12/937; coelhos 181 a 186, em 10/2/938; coelho 199 em 28/3/938. No dia 5/4/938 os coelhos 176 e 179 a 183 receberam o virus de Minas Gerais, 3 coelhos

184 a 186 foram inoculados com o virus R. M.; o n.º 199 foi inoculado com este virus em 6 5 938. A' excepção do coelho 199, que não mais foi inoculado, todos os demais foram reinoculados crusadamente com os virus R. M. e M. G., no dia 6/5/938.

Como mostram os graficos ns. 13 e 14, a maioria dos coelhos não reagiu á 2.ª inoculação de virus, apenas 2 tendo tido reação febril pro-

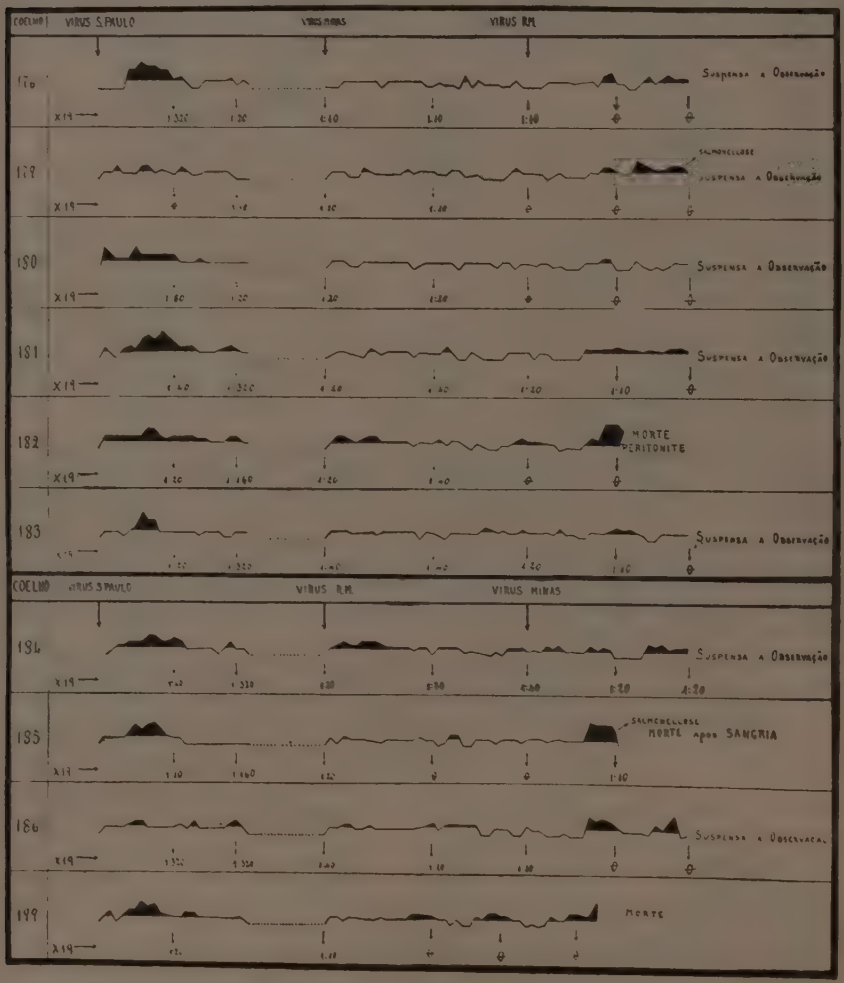


Grafico 14

longada (182, 184) nitida. Em seguida á 3.ª inoculação, porém, a maioria dos coelhos sofreu elevação de temperatura acima de 39.6° por varios dias, mas constatamos por hemocultura tratar-se de uma salmonelose, complicação aliás comum nos nossos coelhos conservados nos bioterios por longo tempo[1].

Nesses coelhos foi acompanhada por provas repetidas a curva do titulo aglutinante do sôro sanguineo para o Proteus X 19. Como se pode vêr no mesmo grafico, não se verificaram elevações significativas do titulo aglutinante em seguida ás reinoculações, não se tendo verificado portanto o fenomeno da reestimulação das aglutininas para o Proteus X 19, o que indicaria a igualdade ou a similhança imunologica dos 3 virus de febre maculosa experimentados.

SUMARIO E DISCUSSÃO

Desde varios anos é conhecida, no Brasil, a existencia dos chamados « tifo exantematico de São Paulo » e « tifo exantematico de Minas Gerais », que foram desde logo reconhecidos como pertencentes ao grande grupo das febres exantematicas ou « rickettsioses ». Os caractéres gerais da infecção, — aspéto clinico, epidemiologico e anatomo-patologico — incluiram-na no grupo da febre maculosa, cujo protótipo é a febre maculósa das Montanhas Rochósas. A sintomatologia da doença humana e experimental, e elevada mortalidade e demais caracteristicas aproximam-na sobretudo da variedade Oéste da febre maculósa das Montanhas Rochosas, tal como grassa no Bitterroot Valey, em Montana.

Estudos imunologicos anteriores estabeleceram a grande semelhança ou mesmo a identidade do virus de São Paulo ao das Montanhas Rochosas.

Com relação ao virus de Minas Gerais, uma conclusão positiva não pôde ainda firmar-se pelas próvas de imunidade crusada, até agora realisadas. De suas experiencias de imunidade crusada entre o virus de Minas Gerais e as de São Paulo e das Montanhas Rochosas, Moreira & Magalhães (1934), concluindo que « Cobaias que se salvaram do virus de Minas podem morrer quando reinoculadas com o virus de São Paulo e morrem quando inoculadas com o virus Rocky Mountain », tendem a diferençar o virus mineiro ao menos do das Montanhas Rochosas.

O valôr protetor da vacina Spencer-Parker da febre maculósa das

[1] O coelho 199, embora não tivesse recebido a 3a. inoculação tambem apresentou o mesmo quadro de infecção intercorrente, com hemocultura positiva, morrendo após um periodo febril mais ou menos acentuado.

Montanhas Rochosas foi diversas vêses ensaiado. Moreira & Magalhães (1934) concluem primeiramente, da observação de 5 cobaias, que « A vacina da Rocky Mountain spotted fever não protege cobaias contra o virus mineiro ». Em trabalho ulterior Magalhães (1937) já pôde verificar um poder protetor parcial da vacina contra o mesmo virus, referindo que duas dóses da vacina protegem cobaias contra a ação mortal do virus, mas não totalmente contra as reações febris, e que uma dóse não protege contra a morte pelo virus mineiro. Magalhães (1938), em trabalho mais recente, descreve uma experiencia em que duas cobaias vacinadas com dóse unica de 1 cc. se mostraram protegidas mesmo contra a reação febril; porém, o fato de haver conseguido reisolar o virus do cérebro destas cobaias, sacrificadas 10 e 11 dias após a inoculação do virus, levou-o a interpretar diferentemente o resultado da próva.

De suas próvas de proteção com sôro de doentes, Moreira & Magalhães (1934) concluiram que « O sôro de convalecente do virus mineiro protege cobaias quando injetado imediatamente após a inoculação virulenta dos virus São Paulo, Rocky Mountain e Minas Gerais ».

Os resultados das diversas próvas imunologicas realisadas com os virus de São Paulo e das Montanhas Rochosas são inteiramente concordantes e demonstram a identidade destes virus. Em pesquisas paralélas, Monteiro (1933) e Parker & Davis (1933 a, b) verificaram que: sôro de coelhos imunes ao virus de São Paulo exerce ação protetora com relação ao virus Rocky Mountain, e vice-versa; e ainda que cobaias que sobrevivem á infecção pelo virus Rocky Mountain adquirem o mesmo grau de imunidade a este virus e ao de São Paulo, e vice-versa. A grande semelhança entre estes virus foi comprovada por Dyer (1933), que tambem verificou a resistencia ao virus São Paulo dos animais sobreviventes ao virus Rocky Mountain. Davis & Parker (1933) acumularam novos dados experimentais demonstrativos da imunidade crusada entre infecções por estes virus, além de provarem o valôr protetôr da vacina Rocky Mountain contra o virus São Paulo, emquanto que concomitantemente Monteiro (1933) obtinha a proteção de cobaias contra o virus Rocky Mountain por meio de uma vacina preparada com carrapatos infectados com o virus São Paulo.

No presente trabalho descrevemos numerosas próvas experimentais — de imunidade crusada, de vacinação e de reestimulação antigenica — realisadas no intuito de esclarecer positivamente as relações imunologicas provavelmente existentes entre os virus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas.

Nas experiencias de imunidade crusada (v. graficos 1-7) foram empregadas 100 cobaias, sendo 56 de próva e 44 testemunhas. As co-

baias de próva, após resistirem á primeira infecção por um dos virus São Paulo, Minas Gerais ou Rocky Mountain, eram reinoculadas a intervalos com os outros dois virus sucessivamente (45 cobaias) ou com apenas um deles (11 cobaias). Algumas cobaias (graficos 5, 6 e 7) foram vacinadas com a vacina R. M. antes de submetidas ás próvas de imunidade crusada. O resultado de conjunto destas próvas acha-se resumido no quadro I, cuja análise passamos a fazer.

Das 56 cobaias que sobreviveram á prévia infecção por um dos virus e que sofreram segunda inoculação, 50, ou 89,1%, sobreviveram: destas, 38 (76%) mostraram-se totalmente imunisadas, não tendo sofrido reação térmica superior a 39,6° C. por mais de 3 dias seguidos, e 12 (24%) mostraram-se parcialmente imunes: das 6 restantes, 5 morreram ou foram sacrificadas sem mostrar sinais de febre maculosa, e 1 foi sacrificada durante a reação apresentando sintomas de febre maculosa.

As cobaias submetidas a terceira inoculação de virus foram em numero de 37. Trinta, ou 81%, resistiram (4 foram sacrificadas após periodo suficiente de observação, das quais 27 (90%) apresentaram uma perfeita proteção e 3 (10%) sofreram reação febril; as 7 restantes morreram de pneumonia intercorrente, sem sinais de febre maculosa.

Das 44 cobaias que serviram como testemunhas da atividade dos virus empregados em segunda e terceira inoculação das cobaias de próva (e que foram 11 do virus São Paulo, 20 do Minas Gerais e 13 do Rocky Mountain), inoculadas com as mesmas dóses usadas, 40 ou 90,9% morreram de febre maculosa em curto praso, 2 (virus R. M.) sobreviveram á intensa reação febril e 2 (virus R. M.) foram sacrificadas durante a reação.

Excluindo do total de animais de próva aqueles cuja morte por infecções intercorrentes invalidou as respectivas observações, verificamos que a percentagem das cobaias que sobreviveram á segunda e terceira inoculação de virus eleva-se respectivamente a 96% e 100%: á exceção portanto de um unico animal que foi sacrificado mostrando sinais de febre maculosa, mas que poderia ter sobrevivido, todos os demais que haviam resistido a uma primeira infecção, resistiram quando mais tarde reinoculados uma ou duas vêses com virus de procedencia diversa. O confronto destas cifras com a de 91%, que é a da mortalidade global das cobaias testemunhas, realça o valôr da próva.

Tratando-se de amostras de tamanha virulencia, estas próvas constituem segura indicação de que, em seguida á infecção por qualquer um dos tres virus em questão, um estado de imunidade se cria no organismo da cobaia sobrevivente, com relação tanto ao virus homólogo como quanto a qualquer dos outros dois, e a ambos sucessivamente. A próva de imu-

nidade crusada é, segundo Pinkerton (1936), talvês a mais importante como critério isolado para a identificação dos virus de rickettsioses. Quando corrétamente realisada e interpretada, ela permite quasi sempre, por si só, identificar fóra de duvida uma amostra de virus desconhecida.

O resultado das próvas de imunidade crusada que realisámos com os virus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas, são, a nosso vêr, demonstrativos da identidade destes virus.

Nossas próvas de vacinação foram feitas não sómente com a vacina Parker original como tambem com vacinas preparadas a partir de carrapatos (*Amblyomma cajennense*) infectados desde larva com o virus Minas Gerais e com o virus São Paulo.

Lotes de cobaia foram injetados por via subcutanea com cada uma das vacinas e, alguns dias após, inoculados com virus-sangue por via peritoneal. Os detalhes sobre estas próvas e seus resultados figuram nos graficos 8 a 11, e os resultados estão reunidos no quadro n.º 2. Foram ao todo empregadas 101 cobaias, das quais 74 foram de próva e 27, testemunhas dos virus.

Das 74 cobaias de próva, morreram 16 de infecções intercorrentes, reduzindo o numero util de cobaias a 58. Dentre estas, sobreviveram á inoculações de virus 46, ou sejam 79%. Destas sobreviventes, 25 (43%) mostraram-se totalmente imunes e 21 (36%) reagiram febrilmente, mostrando-se, portanto, parcialmente imunes.

Dentre ainda as 58 cobaias em que a próva foi completada, 12 (20%) apresentaram febre maculosa, tendo morrido 8 e sendo sacrificadas 4.

As 27 cobaias testemunhas tiveram febre maculosa tipica (100%), das quais morreram 25 e foram sacrificadas 2.

A percentagem de animais vacinados que tiveram febre maculosa somada á dos que reagiram á inoculação dos virus (36 + 20 = 56%), indica que o poder protetor das vacinas empregadas deixou a desejar. Entretanto, foi muito significativa a percentagem conseguida de sobrevidas (= 79%), e bem assim, a das cobaias que se mostraram protegidas mesmo contra as reações febris, isto é, totalmente imunisadas (= 43%).

E' sabido que as vacinas do tipo Spencer-Parker gosam de poder protetor mais evidente contra a mortalidade do que contra a morbilidade, no homem como nos animais. O estado de imunidade por elas conferido, bastante muitas vezes para prevenir a morte, nem sempre é suficiente para impedir a manifestação de febre e de outros sintomas devidos a maior ou menor ação patogenica desenvolvida pela circulação do virus no organismo. Póde ser muito diverso o poder protetor de diferentes partidas de vacinas deste tipo e, ainda mais, uma mesma partida póde ofe-

recer grau variavel de proteção para a mesma especie de animal. « A small amount of a given lot of vaccine may protect one guinea-pig while an equal and sometimes larger amount of the same material fails to protect another animal of approximately equal weight » (Spencer & Parker, 1925).

Devido a essa variabilidade, e á diversidade das condições em que praticámos nossas prôvas de vacinação, não nos é possivel comparar o poder protetor de cada uma vacina com o das outras, nem o poder imunisante de cada uma delas com relação aos diversos virus.

Estas provas mostram entretanto que vacinas de carrapato preparadas com um dos virus (R. M., S. P., M. G.) podem proteger cobaias contra a morte e contra as reações febris tanto com relação ao virus com que foram preparadas, como quanto a um dos outros ou a ambos. Além dos virus homólogos respectivos, as vacinas Rocky Mountain e São Paulo protegeram contra o virus de Minas Gerais, e a vacina Minas Gerais contra os virus São Paulo e Rocky Mountain.

Ao comunicar ao Dr. Parker os resultados de nossas provas de vacinação, feitas com partidas de vacina de fraco poder protetor, assim nos expressámos: « The protective value of the lots of tick-vaccine we used in the tests was rather poor, but it proved to be about the same for different strains of virus. Since the concerned viruses were so virulent, specially the Minas Geraes strain, we think the *partial immunity* afforded by different vaccines to many guinea-pigs, together with the *complete immunity* that some animals proved to have acquired, is a result which suggests the identity of the three viruses ». Perfeitamente concordante foi a conclusão de Parker, baseada nos resultados de sua experiencia 112 (vide grafico 12): « Spotted fever vaccine protects against Minas Geraes virus equally as well as against spotted fever virus » (comunicação pessoal).

Como as prôvas de imunidade crusada, as de vacinação são sugestivas da identidade imunologica dos tres virus de febre maculosa.

Nas prôvas de reestimulação antigenica empregámos 10 coelhos. Inoculados primeiramente com o virus São Paulo, apresentaram reação febril em seguida á qual o sôro sanguineo de alguns deles passou a aglutinar o Proteus OX 19 aos titulos maximos de 1/160 e 1/320, caindo depois o titulo aglutinante a 1/10 e 1/40. Submetidos á reinoculação, 6 coelhos com o virus Minas Gerais e 4 com o virus Rocky Mountain, não se observou elevação significativa do titulo aglutinante de seus sôros, o mesmo se verificando mais tarde quando 9 coelhos foram crusadamente reinoculados.

Foi, portanto, negativa a próva de reestimulação antigenica feita com os tres virus, o que é sugestivo de sua identidade.

As próvas de imunidade crusada, vacinação e reestimulação antigenica, que realisamos, demonstram claramente, a nosso vêr, a identidade imunologica entre os virus Minas Gerais, S. Paulo e Rocky Mountain. Esta conclusão está plenamente de acôrdo com o conjunto de conhecimentos adquiridos sobre febre maculosa, que nos mostram quanto tem de comum a febre maculosa das Montanhas Rochosas e a que grassa nos Estados de S. Paulo e Minas Gerais: o quadro clinico e anatomopatologico, no homem e nos animais de experiencia; a transmissão por carrapatos e a epidemiologia; a aglutinação dos Proteus X pelos imunessôros; a morfologia das rickettsias, o tipo de celulas que invadem e sua distribuição no interior delas, são outros tantos elementos que nos permitem julgar os virus considerados como um mesmo virus, produzindo uma mesma doença.

CONCLUSÃO

Os resultados das provas de imunidade crusada, de vacinação e de reestimulação antigenica, descritas neste trabalho, permitem assegurar a identidade imunologica dos virus de febre maculosa isolados em Minas Gerais, em São Paulo e nas Montanhas Rochosas.

AGRADECIMENTOS

Os autores aproveitam a oportunidade para manifestar seu reconhecimento ao Dr. R. R. Parker, Diretor do Laboratorio das Montanhas Rochosas, pelas amostras de virus que bondosamente nos enviou; ao Dr. O. Magalhães, Diretor do Instituto Ezequiel Dias, pelo mesmo motivo; ao Dr. A. Vallejo, do Instituto Butantan, pelos demonstrativos graficos que organisou; e ao Sr. Zely Figueiredo, pelo muito que nos auxiliou em São Paulo, durante a realisação do presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

Davis, G. E. & Parker, R. R.

1933. Additional studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain spotted fever and São Paulo exanthematic typhus. Publ. Health Rep., Wash., **48** (33) : 1006-1011.

Dias, E. & Martins, A. V.

1938. A preparação da vacina de Spencer e Parker contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas, no Rocky Mountain Laboratory, em Hamilton, Montana, Estados Unidos. O Hospital, Rio de Janeiro, **13** (1): 55-70.

Dyer, R. E.

1933. Relationship between Rocky Mountain spotted fever and exanthematic typhus of São Paulo. Publ. Health Rep., Wash., **48** (20).: 521-522.

Magalhães, O.

1937. Typho exanthematico de Minas Geraes. Transmissão pelo carrapato americano. Outras experiencias. Brasil Med., Rio de Janeiro, **51** (34): 871-873.

1938. Typho exanthematico de Minas Geraes. 10.ª communicação. Brasil Med., **52** (4) : 115-116.

Moreira, J. A. & Magalhães, O.

1934. Typhus exanthematico em Minas Geraes. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, **28** (2) : 225-234.

Parker, R. R. & Davis, G. E.

1933 a. Protective value of convalescent sera of São Paulo exanthematic typhus against virus of Rocky Mountain spotted fever. Publ. Health Rep., **48** (19) : 501-507.

1933 b. Further studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain spotted fever and São Paulo exanthematic typhus. Publ. Health Rep., **48** (29) : 839-843.

Monteiro, J. L.

1933. Vaccina contra o « typho exánthematico » de São Paulo. Novas correlações entre esta infecção e a febre maculosa das Montanhas Rochosas. Memorias do Instituto Butantan, **8** : 3-12.

Pinkerton, H.

1936. Criteria for the accurate classification of the rickettsial diseases (Rickettsioses) and of their etiological agents. Parasitology, **28** (2) : 172-189.

Spencer, R. R. & Parker, R. R.

1925. Studies on Rocky Mountain spotted fever. Vaccination of Monkeys and Man. Publ. Health Rep., **40** (41): 2159-2167. (V. Hygienic Laboratory Bull. n.º 154, P. H. S., Washington, 1930, pp. 28-36).

Sobre os efeitos vasomotôres exercidos pela agua distilada e pelas soluções anisotonicas de clorêto de sodio *

por

Antonio Augusto Xavier

Em publicações anteriores, mostrámos que um afastamento, mesmo pouco importante do titulo isosmotico das soluções fisiologicas empregadas correntemente nas chamadas experiencias de perfusão, era suficiente para determinar, na rêde capilar das preparações de patas posteriores da rã, reações vaso-motôras intensas. A soma de trabalho experimental então realisada foi resumida numa curta nota publicada na Sociedade de Biologia de Paris. O presente trabalho visa relatar de modo menos sucinto os fatos então verificados e referir outros resultados de experiencias, efetuadas naquela mesma ocasião e até hoje não publicadas.

METODO

Em nossas primeiras experiencias utilizámos a preparação de Laewen-Trendelenburg, que consiste, como é sabido, na perfusão das patas posteriores da rã. Para isso, uma canula fina é introduzida na aorta (canula afluente), e uma outra canula, com a extremidade acotovelada, inserida na veia abdominal (canula efluente). Fizemos mais tarde, e porque nossos resultados estivessem em desacôrdo com os de Flatow e Morimoto, publicados naquela mesma ocasião, novas pesquisas num outro objéto de experiencia, a preparação de orelha de coelho isolada e perfundida segundo o método de Pissemski-Krawkow.

As soluções perfusoras empregadas fôram, respectivamente, para a preparação de Laewen-Trendelenburg, o liquido de Göthlin, cujo pH era mantido em 7,3 por uma mistura amortecedora de bifosfato — monofosfato de sodio, e a solução de Ringer-Locke para o preparado de Pissemski-Krawkow.

---

* Recebido para publicação a 11 de Outubro de 1938 e dado á publicidade em Julho de 1939.

Dedicado ao Prof. Oscar de Souza, por ocasião de sua festa jubilar no magisterio da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro.

Como liquidos hipo- e hipertonicos empregámos soluções de NaCl cujo teôr variava de 0.1 a 0.6 p. 100 para as soluções hipotonicas a serem utilisadas na preparação de patas posteriores da rã; e de 0.65 a 0.85 p. 100 para aquelas a ensaiar na preparação de orelha de coelho. O teôr das soluções hipertonicas de NaCl, só ensaiadas na preparação de Laewen-Trendelenburg variou de 1.0 a 7.0 p. 100.

As variações para mais ou para menos do calibre dos vasos, eram notadas a cada momento, contando-se o numero de gotas drenadas por minuto pela canula efluente, na preparação de Laewen-Trendelenburg; ou que escorriam de um coletor de papel de filtro, na técnica de Pissemski-Krawkow.

RESULTADOS

Experiencias com a preparação de patas posteriores da rã. — Na preparação de Laewen-Trendelenburg os resultados fôram os seguintes: *a*) a agua distilada determina, na rêde capilar das patas posteriores da rã, efeito vaso-constritor muito energico; *b*) as soluções hipotonicas de NaCl produzem igualmente vaso-constrição, tanto mais nitida quanto mais baixa é a concentração osmotica da solução; *c*) as soluções moderada- e fortemente hipertonicas produzem vaso-dilatação bastante energica, mas muito curta, substituida progressivamente por vaso-constrição duradoura; *d*) as soluções hipo- e hipertonicas, cuja concentração osmotica é proxima da concentração isotonica, são indiferentes; *e*) após a perfusão de soluções fortemente hipertonicas, a preparação não torna mais á sua condição primitiva; as soluções moderadamente hipertonicas, entretanto, não produzem alterações permanentes; *f*) a agua distilada e as soluções hipotonicas, do mesmo modo, não determinam modificações irreversiveis.

Flatow e Morimoto haviam verificado tambem, nessa mesma ocasião, os efeitos vaso-motores determinados pela agua distilada e pelas soluções salinas hipo- e hipertonicas, mas com técnica diferente, e resultados tambem inteiramente diferentes dos nossos. Esses autores haviam realizado experiencias em cães, com um método proposto pouco antes por Schilf. Com esse método avalia-se o grau de dilatação ou de constrição dos capilares de um determinado territorio vascular pela quantidade de sangue que se escôa de uma veia eferente desse territorio. As substancias cuja ação se quer estudar são introduzidas diretamente na arteria aferente. É necessario antes, tornar o sangue incoagulavel.

Com o método de Schilf, os autores citados, experimentando em cães, obtiveram resultados inteiramente opostos áqueles por nós obtidos.

Segundo Flatow e Morimoto, a injeção de 1 cc. de agua distilada determina vaso-dilatação energica, emquanto igual quantidade de solução de NaCl a 0.9 p. 100, ou de liquido de Ringer, não têm influencia. Soluções salgadas hipotonicas (concentrações de NaCl entre 0.3 e 0.7 p. 100) produzem igualmente vaso-dilatação, concentrações mais altas atuando como as soluções isotonicas. Soluções hipertonicas de NaCl, ao contrario, já em pequena concentração hipertonica, produzem vaso-constrição seguida de vaso-dilatação secundaria.

Não tivemos oportunidade, naquele momento, de verificar as experiencias de Flatow e Morimoto, nem o fizemos até agora, e não podemos, por isso, ajuizar até que ponto é justa a explanação sugerida por Flatow para elucidar a divergencia entre os nossos resultados, obtidos na preparação de Laewen-Trendelenburg e os seus proprios, em cães, com o método de Schilf. Pensa Flatow ser possivel explicar aquelas discordancias porque «as diferentes especies animais reagem de modo diferente ás diferentes drogas» [1].

Experiencias com a preparação de orelha de coelho segundo Pissemski-Krawkow. — Dadas estas discrepancias entre os resultados de Flatow e os nossos, empreendemos uma nova série de pesquisas em uma outra preparação de capilares. Como era possivel fossem as diferenças assinaladas meramente devidas ao fato de termos utilizado em nossas primeiras experiencias uma preparação de animal poiquilotermo, e bem certos de que não era possivel aplicar tais resultados, sem mais exame, ao sistema vascular dos animais de sangue quente, fizemos novas experiencias utilizando agora uma preparação de animal homeotermo, a orelha de coelho isolada e perfundida segundo o método de Pissemski-Krawkow.

Os resultados obtidos nessa ultima preparação fôram identicos aos anteriormente verifcados com o metodo de Laewen-Trendelenburg, quer para a agua distilada, quer para as soluções hipotonicas de NaCl, isto é, tanto uma como as outras determinam vaso-constrição.

---

[1] Carta que recebemos de Flatow, juntamente com seus trabalhos, quando lhe enviámos nossos escritos.

COMENTARIO

Mesmo antes de controlarmos nossas pesquisas, realisadas na preparação de patas posteriores da rã, por esta nova série de experiencias num preparado de capilares de animal homeotermo, algumas restrições poderiam ser desde logo formuladas á explanação sugerida por Flatow, para interpretar as divergencias citadas. É bem certo não reagirem os diferentes tecidos aimais de modo uniforme ás variadas substancias com eles postas em contacto. Seja citado, por lembrança, o caso da histamina, determinando energica constrição das arterias dos animais homeotermos (Dale e Laidlaw), mas não exercendo qualquer influencia sobre os capilares da preparação de patas posteriores da rã (Handowsky e Pick).

Entretanto, a situação aqui é bem diversa, as condições diferentes em que as experiencias fôram realizadas, podendo, talvez, por si só explicar as diversidades encontradas. Trata-se, de um lado, de experiencias feitas no animal intacto, sob anestesia, e além disso, sujeito á influencia de uma substancia destinada a tornar o sangue incoagulavel; de outro lado, de resultados obtidos em condições muito mais simples e muito menos passiveis de objeções, quais os observados em experiencias efetuadas na preparação de patas posteriores da rã.

Aliás, Flatow e Morimoto, numa publicação posterior, referem novas experiencias feitas em gatos, com o mesmo método de Schilf, e estabelecem um confronto com as experiencias feitas anteriormente em cães. Nas experiencias em cães (patas posteriores) o efeito vaso-dilatador da agua foi verificado sem exceção. Em gatos observa-se, em regra, uma dilatação dos vasos das extremidades: o grau de dilatação vascular apresenta, entretanto, variações individuais, e é, em geral, menor do que no cão. Em alguns animais, a agua distilada não produziu nenhum efeito, e em um caso — entre 40 gatos observados — a agua distilada determinou constrição dos vasos das extremidades. A dilatação dos vasos perifericos determinada pela agua, nos gatos, é portanto menos pronunciada e menos constante do que nos cães.

Nesse mesmo trabalho assignalam Flatow e Morimoto experiencias não publicadas de Flatow, em coelhos, ainda com o mesmo método, antes utilisado em suas pesquisas em cães e gatos, já citadas.

Os resultados dessas experiencias em coelhos são inteiramente comparaveis aos nossos.

Nesse animal verifica-se constrição passageira dos vasos das extre-

midades, determinada pela agua, e igual resultado se obtem com a perfusão dos vasos da orelha no animal intacto.

Nossas experiencias verificadas na preparação de Laewen-Trendelenburg fôram mais tarde confirmadas em seus minimos detalhes por Flatow e Osawa, esses autores tendo utilizado, nestas suas pesquisas, o mesmo método de perfusão das patas posteriores da rã, por nós aproveitado antes para realizar o mesmo objetivo.

Nossos resultados estão, de resto, em perfeita harmonia com as experiencias de Baehr e Pick, efetuadas num outro objéto de experiencia (musculos bronquicos de cobaio, no pulmão isolado e perfundido). Verificaram Baehr e Pick, que as soluções salgadas levemente hipotonicas (redução do teôr de NaCl dos liquidos de perfusão de 0.85 a 0.7 p. 100) determinam energico espasmo da musculatura bronquica.

CONCLUSÕES

1 — Em ambas as preparações de capilares utilizados (patas posteriores da rã segundo Laewen-Trendelenburg e orelha do coelho segundo Pissemski-Krawkow), a agua distilada determina efeito vaso-constritor energico.

2 — As soluções hipotonicas de NaCl (de 0.1 a 0.6 p. 100 para a preparação de Laewen-Trendelenburg; de 0.6 a 0.8 p. 100 para a preparação de Pissemski-Krawkow), do mesmo modo, exercem ação vaso-constritora.

3 — As soluções hipo- e hipertonicas, cuja concentração é visinha da isotonia são indiferentes.

4 — As soluções moderada- e fortemente hipertonicas (de 1.0 até 7.0 p. 100) produzem vaso-dilatação energica, mas passageira, logo substituida por vaso-constrição (experiencias verificadas na preparação de Laewen-Trendelenburg).

SUMMARY AND CONCLUSIONS

VASO-MOTRICITY INDUCED BY DISTILLED WATER AND ANISOTONIC SALT SOLUTIONS

The writer reports experiments done with distilled water and hypotonic and hypertonic salt solutions of definite osmotic concentrations. The experiments were performed according to the Laewen-Trendelen-

burg technic using the vascular system of the frog's hind legs, and according to the Pissemski-Krawkow method using the capillaries of the rabbit's ear. Both preparations react to distilled water by marked vaso-constriction, the same phenomenon taking place in the case of the hypotonic salt solutions. The lower the concentration of the hypotonic salt solution the stronger the vaso-constriction obtained. With hypertonic salt solutions was observed a strong but rather transient vaso-dilatation followed by secondary vaso-constriction. The later results were found only in the experiments with the frog's hind legs.

BIBLIOGRAFIA

Baehr, G. & Pick, E. P.

1913. Naunyn-Schmiedebergs Archiv, **74** : 59.

Dale & Laidlaw

1910. Journ. of Physiol., **41** : 318; e 1911, **43** : 182. (Cit. por Handowsky & Pick).

Flatow, E. & Morimoto, M.

1928. Naunyn-Schmiedebergs Archiv, **131** : 152.
1928. Klin. Wochschr., **7** (27) : 1265.

Flatow, E. & Osawa, J.

1929. Naunyn-Schmiedebergs Archiv, **140** : 220.

Handowsky, H. & Pick, E. P.

1913. Naunyn-Schmiedebergs Archiv, **71** : 89.

Schilf, E.

1927. Naunyn-Schmiedebergs Archiv, **126** : 37.

Xavier, A. A.

1928. C. R. Soc. Biol., **100** : 940.
1929. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl. **1** (9) : 152 e 154.

Nova especie do gênero Gyropus *

(Mallophaga)

por

Fabio Leoni Werneck

(Com 8 figuras no texto)

Em recente viagem á Bolivia, nos foi dado colecionar grande numero dos mallophagos habituais aos *Ctemonys* de Santa Cruz de la Sierra, roedores aí conhecidos pela denominação popular de *coguchi*. Procurando determinal-os, nos convencemos que pertenciam á uma especie não descrita. Entretanto, para afastar possiveis causas de erro, enviamos alguns exemplares a Ewing, a quem pedimos que os comparasse a *Gyropus ewingi* e *Gyropus latipollicaris*, especies que desconhecemos e cujos tipos se encontram no Museu de Washington. O resultado deste exame nos foi comunicado em carta de 15-IX-1938, nos seguintes termos: « The two specimens of *Gyropus* which you sent in for comparison apparently belong to my *Gyropus wetmorei*. I had only females when I describe this species, and since there are two irregular transverse rows of setae to a single abdominal segment in the female, I placed the species in *Gyropus*. It is interesting to me to note that in the male there is but a single transverse row of setae to an abdominal segment. The female you sent agrees with the type of *G. wetmorei*, hence this should be the name of the species ».

Não nos foi possivel, porém, adotar esta determinação, por motivos varios.

Em 1935 pedimos a Ewing que determinasse os especimens das laminas 1366 e 1369 de nossa coleção, femea e macho do genero *Gyropus*, colhidos em *Ctenomys budini* (= *Ctenomys utibilis*), de Jujuy, Republica Argentina. Atendendo, amavelmente, á nossa solicitação, este autor nos informou em carta de 25-IV-1935: « N.os 1366 and 1369 taken from *Ctenomys budini* appear to be my *Gyropus wetmorei*. I had only females. These appear to be identical with the female you sent in ». Ambas as laminas nos foram devolvidas, tendo nos rotulos a mesma determinação. Baseados nesta opinião, a mais autorisada no caso, re-

* Recebido para publicação a 13 de Outubro de 1938 e dado á publicidade em Julho de 1939.

descrevemos, em trabalho publicado em 1936, *Gyropus wetmorei* servindo-nos destes especimens.

Ora, as especies examinadas por Ewing em 1935 e 1938, são indiscutivelmente diferentes, embora ambas possam ser identificadas a *Gyropus wetmorei*, isto porque a diferença existente só é percebida, com nitidez, pelo confronto dos machos e pela circumstancia de *Gyropus wetmorei* ter sido descrito unicamente de especimens do outro sexo. Em ambos os exames o referido autor procedeu do mesmo modo: identificadas as fêmeas, atribuiu aos machos o mesmo nome. Nós, entretanto, não podemos adotal-o para dois machos diferentes. Trata-se, portanto, de saber qual deles deve ser tido como *wetmorei*: julgamos que o primeiro, isto é, o colhido em *Ctenomys budini*, determinado em 1935 por Ewing e por nós redescrito em 1936, visto já lhe ter sido atribuido este nome especifico e nada indicar estar mal aplicado. O segundo, será descrito, linhas abaixo, como nova especie.

Em apoio a decisão adotada, cumpre-nos dizer não serem as duas fêmeas absolutamente iguais, comquanto não possamos emprestar á diferença verificada valôr especifico decisivo. Ambas apresentam duas filas transversais de cerdas na face tergal dos segmentos abdominais tipicos. Em *wetmorei* todas as cerdas são aproximadamente do mesmo comprimento; em *grypophallus* as da fila anterior são consideravelmente menores que as posteriores. Da descrição original de *wetmorei* consta: « Abdomen about two-thirds as broad as long and clothed with conspicuous setae », o que mais concorda com o observado na especie que descrevemos em 1936. Não é de supôr que Ewing deixasse de referir a notavel diferença de tamanho das cerdas das duas filas, que desperta a atenção ao exame mais superficial.

Seria desnecessario trazer á publico estes fatos, se não fosse o receio do que poderá suceder mais tarde. Os primeiros especimens nos foram devolvidos; os ultimos cedemos ao museu de Washington, onde permanecerão certamente com a determinação que lhes foi dada por Ewing. Nestas condições é de prever que, no futuro, quem se servir do material determinado por este autor para estudo de suas especies, atribua, muito naturalmente, a *Gyropus wetmorei* os caractéres verificados nas preparações aí arquivadas.

Devemos dizer que não ha, de nossa parte, censura alguma ao modo de proceder de Ewing. Como já dissemos seu procedimento foi, em principio, acertado de ambas as vezes. Apenas, da segunda, se esqueceu que já havia determinado anteriormente como *wetmorei* um macho nitidamente distinto, o que se explica pelo fato deste exemplar nos

ter sido devolvido e pelo espaço de tempo, relativamente longo, decorrido entre as duas determinações.

Cumpre-nos testemunhar aqui nossos agradecimentos ao Dr. Oswaldo José da Silva, do Serviço de Febre Amarela, á cuja solicitude devemos a oportunidade de examinar os *coguchi* de Santa Cruz de la Sierra e ao Snr. T. C. S. Morrison-Scott, do Museu Britannico, que gentilmente os determinou.

Gyropus grypophallus n. sp.

DESCRIÇÃO: — Femea (fig. 1). Comprimento: — 1.62 mm.

Cabeça (fig. 3) ligeiramente mais larga do que longa, apresentando reentrancias acentuadas ao nivel dos palpos maxilares, seios antenais e borda

Fig. 1 — *Gyropus grypophallus*, femea.

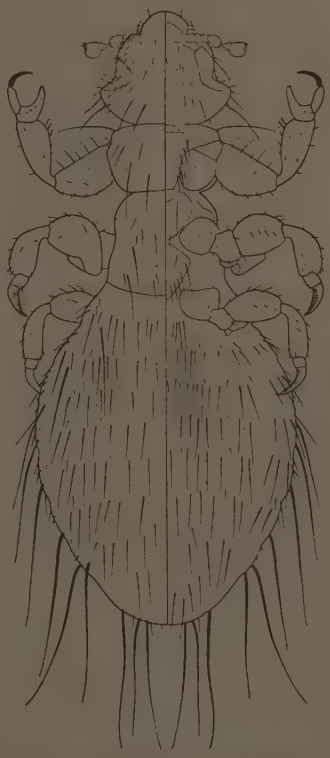


Fig. 2 — *Gyropus grypophallus*, macho.

occipital. Temporas salientes e angulosas. Antenas longas, com quatro segmentos como nas demais especies do mesmo gênero. Palpos maxilares, com quatro articulos tambem, implantados junto ás margens da cabeça, ultrapassando-as; visiveis, em grande extensão, quando o inséto é examinado por sua face superior. Em ambas as superficies da cabeça se encontram alguns pêlos, em numero relativamente pequeno, mas, em geral, de grande comprimento: na face superior, os seis maiores, formam uma fila transversal na região occipital; na inferior, todos êles se dividem em dois grupos, situados a igual distancia da linha mediana e das margens laterais, estendidos no sentido anteroposterior e tendo as ultimas cerdas bem mais longas que as anteriores.

Fig. 3 — *Gyropus grypophallus*, cabeça da femea.

Fig. 4 — *Gyropus grypophallus*, placas externais.

Torax vez e meia mais longo que a cabeça; sua maior largura, porém, é ligeiramente inferior á dimensão correspondente desta ultima. Aparentemente constituido por dois unicos segmentos, sendo o anterior formado pelo protorax e o posterior, com comprimento duplo, pela reunião do meso e metatorax. Na face superior do torax ha algumas cerdas, principalmente no pterotorax; as maiores, porém, se implantam no protorax, junto aos estigmas respiratorios e nos angulos anterolaterais deste segmento. Na face inferior devemos notar as placas esternais, representadas na fig. 4. Destas, a primeira é trapezoidal, com a borda anterior aproximadamente tres vezes maior que a posterior e as laterais, convergentes, guarnecidas por cinco cerdas longas;

a mediana, escutiforme, apresenta dois lobulos anteriores, com uma cerda comprida na base, e duas outras do mesmo tamanho na extremidade posterior da placa; a terceira e ultima é subrombica, tendo na zona mediana uma região alongada de maior espessamento e nas margens posterolaterais e no angulo posterior cerca de treze cerdas identicas ás já referidas.

Membros implantados a igual distancia da linha mediana e de formas distintas. Os femures anteriores são normais, emquanto que os medianos e os posteriores se encontram modificados, apresentando uma goteira para receber os segundos segmentos tarsais; esta modificação, no emtanto, é mais acentuada nos do segundo par, que ainda diferem dos posteriores por possuirem todas as suas partes componentes mais robustas. O primeiro segmento tarsal dos membros anteriores é ligeiramente dilatado, em forma de polegar; o segundo segmento, nos mesmos membros, é normal e possue unha normal tambem, o que não se verifica nas pernas medianas e nas posteriores, onde das unhas só se acham vestigios e o ultimo segmento do tarso é longo, curvo, e estriado transversalmente.

Fig. 5,— *Gyropus grypophallus*, genitalia da femea.

Abdomen largo e curto, tendo de comprimento pouco mais de metade do comprimento total do inséto e de largura cerca de quatro quintos de seu proprio comprimento. Totalmente membranoso. Margens laterais levemente onduladas e guarnecidas por longas cerdas implantadas nas proximidades dos estigmas respiratorios; na extremidade posterior do abdomen se encontram, de cada lado, duas cerdas identicas. As cerdas da face superior, se estendem em filas transversais, formando em cada segmento tipico duas filas: uma de pêlos pequenos e outra de cerdas maiores. A chaetotaxia da face inferior é, mais ou menos, a mesma; nota-se, porém, maior acumulo de pêlos na região mediana da metade anterior do abdomen.

Seis pares de estigmas respiratorios abdominais.

A região genital (fig. 5) apresenta, de cada lado, uma série de cerdas, dispostas em linha curva de concavidade voltada para dentro, cujo comprimento cresce gradativamente de deante para trás; as duas primeiras são rijas como espinhos. Por deante destas filas de cerdas, bem como na linha mediana, se acham pequenas areas de tegumento pigmentado.

Macho (fig. 2). Comprimento: 1.41 mm.

Pouco difere da femea: abdomen mais curto e oval e, talvez, guarnecido por menor numero de cerdas. O principal caráter sexual secundario reside na grande dilatação, em forma de polegar, do primeiro segmento tarsal dos membros anteriores.

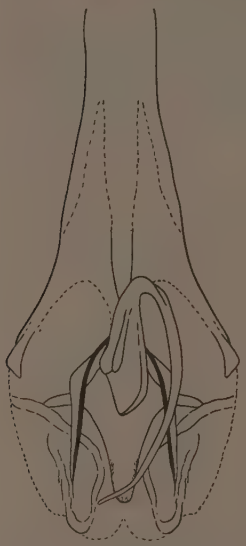


Fig. 6 — *Gyropus grypopallus*, aparelho copulador do macho (aspéto ventral).

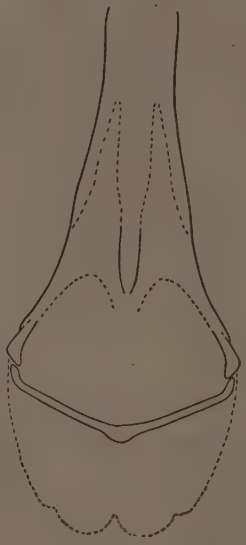


Fig 7 — *Gyropus grypopallus*, aparelho copulador do macho (aspéto dorsal)

Fig. 8 — *Gyropus grypophallus*, penis.

Aparelho copulador (figs. 6 e 7) do mesmo tipo que os de outras especies parasitas de hospedadores do gênero *Ctenomys*. Devemos nos referir, apenas, ao pseudo-penis sem ramo terminal e com os laterais formando grande angulo obtuso e ao penis de forma caracteristica (fig. 8). Este, no grande numero de exemplares de que dispomos, se apresenta sempre com o mesmo aspéto: em forma de gancho, com a extremidade anterior fortemente dilatada e a posterior adelgaçada.

Hospedador tipo: — *Ctenomys lewisi* Thos., de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

Tipo: — Lamina 2227 com um macho.

Alotipo: — Lamina 2223 com uma fêmea.

Paratipos: — Laminas 2224, 2225, 2226 com 3 fêmeas e 2228, 2229, 2230 com 3 machos. Material não montado, conservado em alcool no frasco 164.

Nota:

Esta especie foi encontrada em muitos exemplares de *Ctenomys lewisi*, dos arredores de Santa Cruz, todos intensamente infestados.

O gênero Schizotrypanum Chagas, 1909 *

por

Emmanuel Dias

Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro

Indice Pags.

Introdução 193
Histórico 194
Evolução e multiplicação no Vertebrado 195
Morfología e ecología 197
Invasão dos tecidos por *Trypanosoma* 198
Divisão de *Schizotrypanum* no sangue 201
Multiplicação do *Schizotrypanum* de morcêgos. 202
Multiplicação continua ou descontinua 203
Logar na classificação 203
Sumario e conclusão 206
Referencias bibliograficas 207

INTRODUÇÃO

Criado por Carlos Chagas em 1909 para o agente etiologico da tripanosomiase americana (primeiramente incluido no gênero *Trypanosoma*), o gênero *Schizotrypanum*, em seguida renegado pelo próprio autôr (Chagas 1911), passou a figurar na sistematica protozoológica óra como sinônimo do primeiro, óra como autônomo e valido, óra reduzido á categoría de sub-gênero. Dividiram-se os autôres como partidarios das mais diversas opiniões, sem que entretanto fôsse a questão devidamente debatida e firmada por ultimo uma opinião unânime. De pouco tempo para cá tem o problema evoluído no sentido de uma provavel solução, de vês que partidarios de opiniões opóstas têm procurado definir própriamente seus pontos de vista, ao mesmo tempo que analisar e discutir os pontos de vista contrarios.

A questão tem sido debatida sobretudo por Dias (1934*a*), a favôr da conservação de *Schizotrypanum* em estado independente, e por Hoare (1936), contra a separabilidade deste gênero de *Trypanosoma*.

* Recebido para publicação a 13 de Setembro de 1938 e dado á publicidade em Julho de 1939.

No presente trabalho propômo-nos revêr a questão, visando principalmente a analise crítica dos argumentos desenvolvidos por Hoare (1936)[1] em defêsa de seu ponto de vista.

HISTÓRICO

Trypanosoma cruzi Chagas, 1909, foi o primeiro nome do parasito, mas em seguida foi para êle criado o gênero *Schizotrypanum* Chagas, 1909, baseado em supósta existencia de multiplicação esquisogônica no organismo animal. Como, porém, diversos investigadores julgassem ter verificado em verdadeiros *Trypanosoma* análogo processo de proliferação, foi Chagas 1911, p. 275 naturalmente levado a concluir que « o gênero *Schizotrypanum* tem evidentemente que desaparecer, chamando-se o parasito outra vez *Trypanosoma cruzi* ». Entretanto, descobriram Hartmann (1910) e Vianna (1911) os corpusculos leishmanifórmes intracelulares — as verdadeiras fórmas de multiplicação do flagelado — ficando lógo depois provado que as chamadas « fórmas esquisogônicas » não eram mais que fórmas evolutivas de outros protozoários (Delanoe 1912, Aragão 1913). Desde então, em virtude mesmo das discordancias e contradições que precederam o conhecimento exáto do ciclo do parasito, dividiram-se os autôres quanto á nomenclatura e posição sistematica do agente etiológico da molestia de Chagas.

Os autôres que opinavam contra a conservação do gênero argumentavam principalmente que, uma vês reconhecido falso o fundamento da multiplicação esquisogônica, avançada como caracteristica, o nome *Schizotrypanum* não mais poderia ser mantido. Emquanto que Chagas (1911) voltou atrás porque foi assinalada supósta esquisogonía em outros tripanosomas, outros autores o fizeram mais tarde, quando ficou evidenciada a não existencia de similhante processo de multiplicação. Entre os que não aceitam o gênero figuram Wenyon (1926, pp. 181, 487), Hoare (1934, 1934*a*, 1935, 1936), Brumpt (1936, p. 339), Craig & Faust (1937, p. 151).

Os que defendiam o novo gênero baseavam-no não mais no caráter primitivo, mas em outros, sobretudo no verdadeiro processo de multiplicação no hospedeiro definitivo. O próprio Chagas chegou mais tarde a esta convicção, tanto que, referindo-se á divisão binaria das leishmanias do *S. cruzi*, diz: « Dieses ist eine nur bei diesem Trypanosom vorkommende biologische Eigenschaft, sodass vielleicht die Bildung einer

[1] Todas as citações que a seguir serão feitas a este autôr, sem indicação de data, referem-se a Hoare (1936).

neuen Gattung *Schizotrypanum* für diesen Parasiten gerechfertigt erscheint» (Chagas, Villela & Rocha Lima 1928, p. 679). Este ponto de vista é aceito pela maioria dos autores que têm se manifestado sobre a questão: Mayer & Rocha Lima (1914, p. 109), Hartmann & Schilling (1917, p. 176), Mayer (1920, p. 895), Da Cunha (1923, p. 19), Le Dantec (1924, p. 559), Calkins (1926, pp. 383-384), Craig (1926, p. 276), Reichenow (1928, p. 603), Niño (1929, p. 12), Kudicke (1930, p. 863), Nöller (1930, p. 1120), Manteufel & Taute (1930, p. 1268), Dias (1934*a*), Marchoux (1934), Iriarte (1936), Stiles (1936), Whitaker (1937), Mesnil (1938), Swartzwelder (1938), etc.

Em trabalho anterior (Dias 1934*a*) mostrámos que não se poderia justificar a inseparabilidade do gênero pela simples alegação da falsidade de suas bases iniciais. De fáto, similhante argumento deixou de ser usado posteriormente por autores que permanecem ainda no mesmo «*status quo ante* 1911, when Chagas himself reverted... to the original name *Trypanosoma cruzi*» (Hoare, p. 99). Atualmente, portanto, podemos considerar como demonstrado que: «O fato de haver sido o gênero de Chagas baseado na existencia de uma multiplicação esquisogônica, e, ainda menos, o de ter sido ele regeitado pelo seu autôr em consequencia de observações errôneas de outros pesquisadores, não óbsta a que, uma vês que se reconheçam outras razões que nitidamente permitam sua caracterisação, seja o mesmo mantido.» (Dias 1934*a*, p. 205).

Restam a discutir ainda essas outras razões e as criticas que lhes têm sido opostas, o que passaremos a fazer, de acôrdo com o conjunto de conhecimentos exatos sôbre a biologia dos Tripanosomideos.

EVOLUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO NO VERTEBRADO

Segundo Dias (1934, p. 204): «Todos os autôres estão de acôrdo em que a multiplicação do *Schizotrypanum cruzi* realisa-se de modo completamente diverso do que é comum aos outros tripanosomas. Ao passo que estes se reproduzem no sangue, em geral por divisão binaria e sob a fórma de tripanosoma, o *S. cruzi* se reproduz nos tecidos, em situação intracelular, sob o aspéto de elementos arredondados desprovidos de flagélo (leishmanias), sendo excepcional a ocurrencia, no sangue circulante, de tripanosomas com sinais mais ou menos definidos de divisão. A ausencia de multiplicação no sangue periférico, á maneira dos outros tripanosomas, e a existencia de uma fáse intracelular de evolução e de multiplicação, constitue a caracteristica biológica principal e, como tal, a principal razão para que se reconheçam os parasitos que a possuem como formando um grupo ou gênero á aprte, distinto do dos verdadeiros ou classicos tripanosomas.»

A principal caracteristica de *Schizotrypanum* é pois constituida por elementos morfológicos e por elementos ecológicos, relativos á fórma e logar onde se processam os fenômenos de divisão, e presupõe duas ordens simultâneas e inseparaveis de fatos: uma positiva, ou seja a multiplicação das leishmanias nos tecidos, e outra negativa, ou seja a ausencia de divisão típica dos tripanosomas sanguicolas. Torna-se evidente, portanto, que similhante caracteristica só será apresentada por aqueles flagelados que em seu ciclo endógeno assumirem os aspétos morfológicos referidos e apresentarem as duas ordens de fatos assinaladas. Assim, por definição, estão excluídos do gênero todos os parasitos que, embora podendo assumir ocasionalmente a fórma de leishmania nos tecidos, *dividem-se normalmente sob a fórma de tripanosoma, no sangue do hospedador* (*T. brucei*, *T. rhodesiense*, etc.), bem como aqueles que habitualmente não se multiplicam sob a fórma de tripanosoma, mas nos quais *sempre faltam os corpusculos leishmaniformes intracelulares* (*T. lewisi*, *T. rabinowitschi*, etc.).

Estas considerações invalidam desde logo as principais objeções opostas por Hoare á principal caracteristica do gênero. Ele tenta primeiramente dividir essa caracteristica em duas partes, 1) « biológica », ou antes « ecológica », e 2) « morfológica », procurando deduzir que a parte « ecológica » foi avançada como principal. Ora, a circunstância de *S. cruzi* sofrer « evolução e multiplicação » nos tecidos não representa sómente um fato ecológico, porquanto o têrmo « evolução » alude naturalmente á sucessão de estadios morfológicos definidos, achando-se ao fato ecológico inseparavelmente ligado o fato morfológico da evolução caracteristica. Esquece-se o autôr de que ele mesmo reconheceu que: « On the grounds that *S. cruzi*, in the course of its development in the vertebrate, « assume alternativement les caractéristiques morphologiques des genres *Leishmania* et *Trypanosoma*. Dias (1934*a*, p. 221 *et seq.*) assigns to *Schizotrypanum* an intermediate position between the two last-named genera » (Hoare, p. 100). Essas bases morfológicas atuais são por ele despresadas quando, combatendo o « criterio ecológico », diz: ... « there can be no justification for the separation of morphologically similar organisms on the grounds of difference in habitat » (Hoare, p. 101), sendo dificil crêr que as palavras « morphologically similar organisms » se refiram ao *S. cruzi* e aos tripanosomas, particularmente aos do grupo *lewisi*. Mesmo admitindo que tenhamos atribuido maior importancia aos caractéres biológicos, nem por isto devem ser esquecidos os reais fundamentos morfológicos em que se baseia o gênero de Chagas: « it is a generally recognised principle, both in zoology and in botany, that the essential criterion in the constitution of a systematic

unit is the morphology of the organisms, the classification of which is based on the difference of structural characters between them » (Hoare, p. 101).

MORFOLOGIA E ECOLOGIA

Nenhum *Trypanosoma* apresenta caractéres morfológicos identicos aos de *Schizotrypanum*. Os flagelados deste ultimo gênero têm a fórma adulta de tripanosoma perfeitamente peculiar, caracterisada pela dimensão do corpo, posição e tamanho do blefaroplasto, assim como tipica é a série de estadios evolutivos por que passam no interior das células animais. As fórmas sanguícolas distinguem-se facilmente das dos tripanosomas verdadeiros, sobretudo das do grupo *lewisi*: foi baseado neste fato que separámos os flagelados de Quirópteros em dois grupos, « vespertilionis » (ou « cruzi ») e « megadermae » (Dias, 1936). O volumoso cinetoplasto em posição subterminal ou terminal, mas nunca subcentral, é elemento estrutural de primeira ordem para o reconhecimento da « very characteristic appearance » (Wenyon 1926, p. 190) dos tripanosomas de *Schizotrypanum*. A distinção destas fórmas das correspondentes do *T. lewisi* e dos tripanosomas gigantescos do mesmo grupo, é facilima, sendo mais delicada quando se trata do *T. vivax* e outros tripanosomas patogenicos (cf. Hoare 1938, fig. p. 337).

No gênero *Trypanosoma*, quando ocorrem modificações estruturais cíclicas no organismo do vertebrado, elas quasi sempre têm logar em parasitos livres no sangue. Isto é verdade no que respeita a todos os tripanosomas de mamiferos, com a exceção talvês do *T. theileri*, caso sejam exatas as observações de Carpano (1932). De qualquer modo, este parasito, bem como alguns tripanosomas de animais de sangue frio (*T. inopinatum*) que parecem apresentar um estadio intracelular, são morfologicamente muito diferentes de *Schizotrypanum*, e consequentemente não devem ser incluidos neste gênero, que deve ser adotado sómente para « trypanosomes answering in morphology and life cycle to the type species, *Schizotrypanum cruzi* » (Craig 1926, p. 276).

Tambem do ponto de vista estrictamente ecológico é caracteristica a evolução endógena dos *Schizotrypanum*, por se realisar em grande parte e necessariamente no interior dos tecidos, de regra sendo os tripanosomas os unicos elementos livres na circulação. A obrigatoriedade da fase intracelular, independentemente mesmo das variações estruturais que nela ocorrem, constitue argumento biológico, ou ecológico, de valôr para a individualisação do gênero. O elemento essencial intracelular é a leishmania ou corpusculo leishmanifórme, que a um tempo é o elemento

reprodutivo e de latencia, responsavel pela longa persistencia das infecções. Tão indispensavel é esse estadio que se póde postular: *sem estadio leishmanifórme não ha infecção por S. cruzi*, o que equivale a dizer: *sem multiplicação intracelular não ha infecção*, conforme se prefira a linguagem morfológica ou a ecológica para exprimir a mesma idéa.

Insistindo em sua argumentação contra o caráter « ecológico », Hoare (p. 101) declara que a diferenciação de *Schizotrypanum* de *Trypanosoma*, baseada na multiplicação do primeiro nos tecidos e do segundo no sangue, é falsa, « since histologically blood represents merely a variety of connective tissue in which the intercellular substance is liquid, while its constituent elements are genetically closely related to those of the reticulo-endothelial system, for which *Schizotrypanum cruzi* shows a particular predilection ». Consideramos de grande importancia a distinção entre fenômenos essencialmente da mesma natureza (multiplicação), mas que ocorrem óra em elementos livres no sangue circulante (*Trypanosoma*), óra em elementos necessariamente alojados no interior de células (*Schizotrypanum*), tanto mais quanto nesta localisação sôfram os parasitos importantes e caracteristicas modificações de estrutura. O fato de ser o sangue méramente uma variedade de tecido conjuntivo com substancia intercelular liquida e de serem suas células geneticamente próximas das do sistema reticulo histiocitario, não nos parece ter a menor relação com a questão de sistematica protozoológica de que tratamos.

O fato é que elementos de ordem ecológica têm valido mesmo para separar não sómente gêneros, mas até familias de outros protosoarios, como no caso da classificação dos Haemosporidiidae em parasitos que completam toda sua evolução no sangue (Plasmodiidae) e parasitos cujo ciclo se passa em parte nos tecidos, em parte no sangue (Haemoproteidae).

INVASÃO DOS TECIDOS POR *TRYPANOSOMA*

Desde longos anos os pesquisadores se têm preocupado com a possibilidade da ocurrencia de um ciclo evolutivo dos tripanosomas nos tecidos dos animais infetados, datando de antes da descoberta de Chagas a famosa questão dos « latent bodies ». Foi, porém, depois dos trabalhos de Chagas (1909), Hartmann (1910) e Vianna (1911) sôbre o *S. cruzi*, que os autôres mais se esforçaram em investigar a existencia de fórmas intracelulares, ou intratissulares, na evolução endógena dos verdadeiros tripanosomas.

Em muitas espécies foram descritos corpusculos arredondados (latent bodies) que, combinados em séries arbitrarias com outras fórmas mais

ou menos definidas, formavam a aparencia de um ciclo evolutivo (cf. Wenyon 1926, pp. 332-333). Numerosas foram tambem as espécies em que se descreveram pseudo-fórmas de multiplicação esquisogônica, similhantes ás que Chagas (1909) inicialmente descrevêra em infecções por *S. cruzi* (cf. Dias 1934*a*, pp. 203-204).

Tanto « fórmas esquisogônicas » quanto « latent bodies » foram finalmente reconhecidos como resultantes de interpretações erroneas: estes não são senão córpos parasitarios de tripanosomas em degeneração mais ou menos avançada, emquanto que as primeiras eram apenas fórmas evolutivas de outros protozoarios, erroneamente incluidas na evolução dos flagelados.

O fato que ficou bem comprovado por numerosas investigações é o de que em nenhum *Trypanosoma* patogenico pôde até agora ser evidenciada a existencia de uma evolução ciclica intracelular, identica á de *Schizotrypanum*, sendo pois verdade que « The genus *Schizotrypanum* Chagas differs from *Trypanosoma* in having an intracellular leishmania phase in the tissues of the vertebrate » (Calkins, 1926, p. 383) — á exclusão das mencionadas possiveis excepções.

Não obstante, afirma Hoare (p. 101) que « the histotropism of *S. cruzi* is by no means exceptional, since other trypanosomes also occur regularly and are capable of multiplication in the « fixed tissues », julgando poder daí concluir que « The difference in this respect between the latter species (*S. cruzi*) and others, being only of degree, merely emphasises their close relationship » (p. 102).

Para sustentar essas afirmações e documentar a « comum ocurrencia » da invasão dos tecidos pelos tripanosomas, apega-se Hoare aos trabalhos de Peruzzi (1928), Hoeppli & Regendanz (1930), Schwetz (1928), Schwetz & Fornara (1928, 1929). Entretanto, estes mesmos trabalhos demonstram que essas fórmas tissulares « não têm a mesma significação que no *Schizotrypanum* » (Dias 1934*a*, p. 206), são involutivas e não evolutivas.

As fórmas observadas por Peruzzi (1928) em infecções por *T. gambiense*, *T. rhodesiense* e *T. brucei*, não foram por ele consideradas como verdadeiras fórmas de evolução intracelular, embóra ás vezes pudessem resultar de multiplicação *in situ*: « Ces manifestations d'invasion céllulaire ont des caractères que révèlent des rapports contractés accidentellement avec le protoplasme altéré, ou vacuolisé par un processus régressif, et ils ne présentent pas les phases d'une évolution cyclique intracéllulaire propres à d'autres trypanosomes » (Peruzzi 1928, p. 293).

Referindo-se a estas observações de Peruzzi, Hoare (p. 101) diz: « These findings and conclusions were later fully confirmed by Hoeppli and Regendanz (1930) ». De fato, estes autores assinalaram fórmas leishmanióides nos tecidos de animais, porém a natureza degenerativa das mesmas foi também assinalada: « es sich hierbei um Involutionsformen der Trypanosomen handelt » (p. 11).

Já anteriormente Regendanz & Hoeppli (1929) haviam assim interpretado não sómente as fórmas que eles mesmos haviam encontrado, como também as que precisamente Peruzzi (1928) e Schwetz & Fornara (1928) acabavam de descrever: « Aenliche abgerundete Formen haben auch Peruzzi bei mit *Trypanosoma gambiense* und mit *Trypanosoma rhodesiense* infizierten Affen und Schwetz und Fornara bei mit *Trypanosoma congolense* infizierten Rindern gefunden. Während der erste sie für Involutionsformen hält, neigen die beiden anderen Autoren zu der Ansicht, dass es sich um Dauerformen der Trypanosomen handle, die sich wieder in Flagellatenformen umwandeln könnten. Es ahnelt sich hier wohl um die früher als « latent bodies » beschriebenen Formen. Wir konnten bisher in unseren zahlreichen Untersuchungen keine Anhaltspunkt dafür finden, dass es sich bei den runden Formen um Evolutions- oder Dauerformen handelt » (Regendanz & Hoeppli 1929, p. 384).

Rodhain (1928) expressou identica opinião a respeito das fórmas descritas por Schwetz & Fornara (1928), ao discutir este trabalho: « L'examen des coupes et des dessins que les auteurs ont join à leur travail m'inclinent à croire que les formes « leishmania » qu'ils ont observées sont plutôt des formes d'involution et non d'évolution ».

Êstes foram os próprios trabalhos que foram invocados para confirmar a asserção de que « invasion of the fixed tissues by trypanosomes and their multiplication in the leishmanial stage are found quite commonly in trypanosomes, and are not limited to *S. cruzi* » (Hoare, p. 102), a qual serviu de base á conclusão de que « the fact that other trypanosomes are capable of multiplication in the leishmanial stage deprives this character of any generic value » (p. 107), muito embóra sejam os estadios leishmaniformes dos tripanosomas patogenicos, provavelmente sinão certamente, méros « latent bodies » de natureza degenerativa.

A « estreita relação » entre os tripanosomas patogenicos e o *S. cruzi* não poderá jamais ser deduzida dos respectivos processos ou estadios multiplicativos no vertebrado, porquanto: 1.º) o processo normal de multiplicação dos tripanosomas patogenicos consiste na divisão binaria das fórmas de tripanosoma no sangue; 2.º) as fórmas arredondadas dos tripanosomas patogenicos ,nos tecidos dos animais, não representam um

estadio evolutivo normal, são antes fórmas inconstantes, de caráter involutivo.

A verdadeira conclusão a ser deduzida do exposto, é a de que a multiplicação e evolução de *Schizotrypanum*, no organismo do vertebrado, constitue caráter de primeira ordem, a um tempo morfológico e ecológico, para a individualisação do gênero.

DIVISÃO DE SCHIZOTRYPANUM NO SANGUE

O processo normal de multiplicação de *Schizotrypanum* no organismo do vertebrado é o da divisão binaria das fórmas de leishmania intracelulares. As critidias podem ainda se dividir, mas a fórma adulta de tripanosoma normalmente não mais é sucetivel de multiplicação: « Longitudinally dividing forms of *T. cruzi*, such as are found in the case of other trypanosome infections, do not occur » ... (Wenyon 1926, p. 490).

Nas escassas observações tendentes a mostrar a comum ocurrencia de divisão do *S. cruzi* no sangue, podem ser entrevistas causas de erro, que decorrem principalmente da particular fragilidade dos tripanosomas. Em consequencia dessa fragilidade as deformações parasitarias são muito frequentes, algumas vezes podendo simular aspétos mais ou menos enganosos de divisão. Assim, têm sido falsamente interpretadas mesmo as frequentissimas alterações mecanicas do cinetoplasto, observadas em esfregaços fixados (apesar de quasi sempre ficarem limitadas a esse corpusculo) e até mesmo deformações de tripanosomas constatadas em grosseiros preparados de gôta espessa. A estrutura dos flagelados no sangue póde ser tambem prejudicada por efeito da intercorrencia de infecções bacterianas, conforme foi assinalado por Niño (1929, p. 602): « en algunas sangres de animales muy parasitados y que sufrieron infecciónes graves y mortales he observado algunos tripanosomas en vía de destrucción y que podrían erroneamente hacer pensar en processos de división longitudinal. »

Como achado extremamente raro póde-se surpreender no sangue de animais tripanosomas do *S. cruzi* aparentando de fato sinais de divisão, fórmas essas que foram por nós interpretadas como parasitos que em vias de divisão sofreram a transformação em tripanosoma (Dias 1934, p. 15, fig. 1). Porém, « A significação da rara ocurrencia de fórmas adultas do *S. cruzi* em aparencia de divisão no sangue é ainda obscura, embóra haja hipóteses que a procuram explicar » (Dias 1934*a*, p. 206), com o que se acha Hoare (p. 106) de acôrdo, considerando-as « unimportant stages, the significance of which in the life cycle is not established. »

A verdade é que praticamente a totalidade dos autores não admite a divisibilidade do *S. cruzi* sob a fórma de tripanosoma e póde ainda hoje repetir com Mayer & Rocha Lima (1914, p. 109, em refutação a Nägler, 1913): « weitgehende Teilungen haben wir in Uebereinstimmung mit Chagas u. a. nicht beobachten können. »

Hoare (p. 102) tenta, não obstante, inutilisar esta legitima caracteristica do gênero: « binary fission of the trypanosome forms of *S. cruzi* in the blood — the absence of which in this trypanosome was advanced as a differential character — occurs more commonly than has been previously assumed (Dias 1934, 1934*a*) ».

Esta asserção não só vai de encontro á verdade admitida, como está em flagrante contradição com reiteradas afirmações suas, admitindo que a divisão do *S. cruzi* e outros parasitos na fórma de tripanosoma « appears to be a rare phenomenon » (p. 105); que « such dividing forms are rarely encountered » (p. 105); que a divisão ocorre « exceptionally in the trypanosome stage » (p. 108); e que « reproduction . . . never takes place in the trypanosome stage » (p. 105). Estas positivas afirmações não impediram que o autor assegurasse: « As regards the other differential character of *Schizotrypanum*, viz. the absence of division in the trypanosome forms of blood, it has also been shown to be without foundation » (Hoare, p. 107).

MULTIPLICAÇÃO DE SCHIZOTRYPANUM DE MORCEGOS

O processo de proliferação do *Trypanosoma vespertilionis* e de outros parasitos de Quirópteros a ele morfologicamente similhantes, permaneceu desconhecido até que Chatton & Courrier (1921, 1921*a*) descreveram os quistos « intratissulares » nos órgãos do *Vesperugo pipistrellus*, constituidos por parasitos critidiomórficos. Deste achado valeram-se os autores para incluir o flagelado no gênero *Schizotrypanum*, sob o nome *S. pipistrelli*.

Os quistos critidianos de Chatton & Courrier, porém, nunca mais puderam ser encontrados. Nos órgãos de morcêgos da mesma espécie, Franchini (1922) só pôde constatar fórmas de leishmania, deixando bem acentuado que « Jamais nous n'avons vu dans les organes des formes crithidiennes » (p. 544). Também em morcêgos do Brasil (*Phyllostomus hastatus*) só foram achados quistos constituidos por elementos leishmaniformes (Dias 1933, 1936). Fórmas de critidia naturalmente existirão, mas apenas como fase de transição; tal como na evolução do *S. cruzi*, também aqui o elemento proliferativo essencial é o corpusculo leishmaniforme.

Baseando-se sómente nos trabalhos de Chatton & Courrier, Hoare (p. 102) argumenta que o caráter essencial da multiplicação no estádio de leishmania falta no *S. pipistrelli*, « *for it reproduces not in the leishmanial stage*, but in the form of a crithidia »; pelo que acha necessario ou retirar este flagelado do gênero, ou modificar a definição de *Schizotrypanum*. Nem uma cousa nem outra deve porém ser feita, desde que foi demonstrado que é sob a fórma de leishmania que se multiplicam estes parasitos de morcêgos.

MULTIPLICAÇÃO CONTINUA OU DESCONTINUA

Nas infecções por tripanosomas de Roedores a proliferação dos parasitos é « descontínua », ocorrendo unicamente em determinados « periodos de multiplicação » que duram pouco tempo ou mesmo um só dia (*T. rabinowitschi*). Hoare coloca o *S. cruzi* entre os tripanosomas do grupo *lewisi*, atribuindo-lhe mais esta caracteristica comum.

Não obstante, a multiplicação do *S. cruzi* é « contínua », não restrita a períodos limitados, do mesmo modo como nas infecções pelos tripanosomas patogenicos. Si é verdade que neste ultimo caso « multiplication is not restricted to any special period, but is continuous, proceeding without interruption throughout the entire course of the infection » (p. 105), também isto é verdade para as infecções por *Schizotrypanum*, com a diferença de que aqui a multiplicação se passa nos tecidos, sob a fórma de leishmania, ao passo que naqueles tripanosomas ela se dá no sangue, sob a própria fórma de tripanosoma[2].

LOGAR NA CLASSIFICAÇÃO

« On the grounds that *S. cruzi*, on the course of its development in the Vertebrate, « assume alternativement les caractéristiques morphologiques des genres *Leishmania* et *Trypanosoma* », Dias... assigns to *Schizotrypanum* an intermediate position between the two last-named *genera* » (Hoare, p. 100).

De fato, as evidentes analogias estruturais deste gênero com os outros dois, indicam-lhe como logar mais adequado o intermediario: no período de multiplicação e latencia, *Schizotrypanum* é uma leishmania, tanto morfológica quanto ecológicamente; e na fase sanguicola é um tripanosoma. Na qualidade de gênero intermediario, *Schizotrypanum*

[2] No nósso trabalho (Dias 1934a) sempre nos referimos de um módo geral á multiplicação dos tripanosomas no sangue, sem entrar em detalhe quanto á fórma sob a qual ela se passava, inconfundivel com a do *S. cruzi*. Assim, na nossa chave de classificação: "la multiplication se fait dans le sang, *généralement* sous la forme trypanosome" (p. 225). E' pois sem rasão que Hoare (p. 102) nos atribui a asserção "also enterely misleading" de que os tripanosomas se dividem no sangue *só* sob a fórma de tripanosoma.

póde figurar em chave com qualquer dos dois outros gêneros, de acôrdo com o critério escolhido, conforme seja ele baseado na morfologia do elemento de multiplicação (leishmania) ou na do elemento circulante (tripanosoma). Na nossa classificação (Dias 1934*a*) elegemos o primeiro critério, o que levou Hoare (p. 100) a dizer: « the new classification ... introduces radical changes in our conception of the Trypanosomidae as a whole, for it not only recognises the independent status of *Schizotrypanum*, but widens the gap between this genus and *Trypanosoma* still further by uniting it with *Leishmania* into a group placed in opposition to *Trypanosoma* ».

Diversos são os autores que, mesmo de longa data, teem salientado o interêsse teórico desses flagelados que no hospedador definitivo são alternativamente uma leishmania e um tripanosoma. Segundo Minchin (1912, p. 296): « The intracellular multiplication recalls strongly that of the parasite of kala-azar. *Schizotrypanum* thus forms an important link between a typical blood-trypanosome, such as *T. lewisi*, and a tissue parasite, such as the species of *Leishmania* » ... De modo similhante pensam Hartmann & Schilling (1917, p. 176): « Die Gattung *Schizotrypanum* erscheint in dieser Beziehung gewissermassen als ein Zwischenglied zwischen *Trypanosoma* und *Leishmania*, indem sie zwar im Blutserum als typisches Flagellat auftritt, die Vermehrung aber in ähnlicher Weise wie *Leishmania* vor sich geht. » « Die Verbindung der Gattung *Leishmania* mit den übrigen Blutflagellaten dürfte durch die neueste Befunde ... gegeben sein, die bei *Schizotrypanum* in dem Körper der Versuchstiere Stadien dieses Trypanosomas fanden, die von *Leishmania* nicht zu unterscheiden sind » (idem, p. 214). Segundo Kudicke (1930, p. 896): « *Schizotrypanum* zeigt im Wirbeltier im begeisselten Stadium eine typische aber nicht direkt teilungsfähige Trypanosomaform und ähnelt den echten Trypanosomen auch in der Entwiecklung im Uberträger. Es unterscheidet sich von ihnen durch das regelmässig Vorkommen geisselloser intrazellulärer Stadien im Wirbeltier, durch die es sich der Gattung *Leishmania* nähert. » « En resumé, le *S. cruzi* est morphologiquement un trypanosome et genétiquement une *Leishmania*. Ce mode de réproduction particulier suffit amplement à séparer ces protozoaires des trypanosomes » ... (Le Dantec 1924, p. 559).

Além da similhança morfológica das fórmas de multiplicação, ha outros caractéres biológicos comuns aos flagelados dos gêneros *Schizotrypanum* e *Leishmania*. Ecológicamente, as fórmas de proliferação são intracelulares, e localisam-se eletivamente em elementos do sistema reticulo-endotelial. Do ponto de vista patológico, nas leishmanioses como nas infecções por *S. cruzi* este sistema organico é essencialmente afetado,

e a verificação de processos ulcerativos nestas ultimas, provocou a asserção de que « Ces faits montrent une fois de plus les analogies entre le *S. cruzi* et les *Leishmania* » (Villela & Dias, 1934). Do ponto de vista serológico, não só foi comprovada a positividade da reação de Machado nas leishmanioses, como também a fixação do complemento em sôros de doentes de Chagas com antigenos preparados com leishmanias (cf. Cunha & Dias, 1939).

Por outro lado, as relações biológicas de *Schizotrypanum* com os flagelados do gênero *Trypanosoma* são manifestas, relativas tanto aos que como ele são transmitidos por contaminação (grupo A) quanto aos tripanosomas patogenicos transmitidos por inoculação (grupo B), dos quais se diferenciam entretanto pelos seus caractéres próprios bem definidos.

A não se aceitar o gênero de Chagas, como classificar esse tripanosoma patogenico que é transmitido por contaminação e se multiplica como uma verdadeira leishmania, ou essa leishmania que aparece no sangue como um tripanosoma?

A ser rigorosamente seguido o critério da morfologia do tripanosoma sanguicola, os *Schizotrypanum* deveriam figurar entre os parasitos do grupo B, pelas dimensões do corpo, tamanho e situação do blefaroplasto, e curta extremidade posterior. A capacidade do *S. cruzi* infetar o homem e diversos animais, determinando muitas vezes infecções mortais, exigir-lhe-ia igualmente logar entre os tripanosomas patogenicos, ao envês de entre os não patogenicos. Mas a colocação no grupo B não se justificaria, devido ao tipo de evolução no inséto e modo de transmissão ao vertebrado.

De outro lado, a colocação dos *Schizotrypanum* no grupo A não é completamente indicada, embóra possuam em comum com os parasitos deste grupo alguns caractéres biológicos, como desenvolvimento na porção posterior do invertebrado, mecanismo contaminativo de transmissão e facil cultivabilidade (o ultimo deixou aparentemente de ser um caráter exclusivo dos tripanosomas não patogenicos, desde que recentes experiencias tendem a mostrar a possibilidade da aplicação util de cultura — hemocultura — como meio de diagnóstico da doença do sôno (cf. Brutsaert & Henrard, 1938); porém, a morfologia dos tripanosomas sanguicolas e a evolução intracelular dos *Schizotrypanum* no vertebrado muito os afasta dos tripanosomas não patogenicos deste grupo. Portanto, os mencionados caractéres biológicos comuns não devem merecer valôr exagerado, ao ponto de forçar num mesmo e unico grupo fórmas tão dissemelhantes quanto *T. lewisi*, *T. melophagium*, *T. theileri*, *T. ingens*, « *T. cruzi* » ...

Um grupo morfológicamente tão heterogêneo como o « grupo *lewisi* »

de Hoare & Coutelen (1933) não poderia ser constituido numa classificação que se baseasse « enterely on the morphology of the trypanosomes, the biological features adduced being only subsidiary characteristics » (Hoare, p. 108).

Considerado todo o ciclo endógeno, é evidente que por seus caractéres morfológicos durante a fórma adulta sanguinea *Schizotrypanum* se aproxima mais dos tripanosomas patogenicos, emquanto que durante o estadio multiplicativo intracelular fica mais próximo dos parasitos do gênero *Leishmania*; as analogias estruturais com os membros do grupo *lewisi* são muito mais remotas. E' insustentavel a afirmativa de que: « the morphology of the trypanosomes, the stages of development, and method of reproduction of these two species (*S. cruzi*, *S. pipistrelli*) in the vertebrate host are of the same type as in members of the *lewisi* group » (Hoare, p. 107).

O quadro anéxo, que reúne os principais caractéres biológicos e morfológicos dos três gêneros de tripanosomideos em questão, mostra que si os pertencentes ao gênero *Schizotrypanum* têm propriedades que os aproximam óra de *Leishmania*, óra de *Trypanosoma*, o conjunto dessas propriedades lhes assegura a situação em um gênero autonomo intermediario, facilmente distinguivel dos demais gêneros de flagelados de mamíferos.

SUMARIO E CONCLUSÃO

No presente trabalho, em que foram analisados os caractéres de *Schizotrypanum* e consideradas suas relações com os de outros flagelados digenéticos, acreditamos ter ficado bem demonstrado que este gênero encontra sólidos fundamentos em que se baseie.

Schizotrypanum possue caractéres morfológicos peculiares, que o aproximam de *Leishmania* no periodo de multiplicação e de *Trypanosoma* na fase sanguinea. Os flagelados pertencentes a esse gênero caracterisam-se não só pela morfologia da fórma de tripanosoma, como pela evolução no organismo do vertebrado. No *S. cruzi*, como no *S. vespertilionis*, a multiplicação se processa nos tecidos, constando da divisão binaria das formas intracelulares de leishmania; os tripanosomas sanguicolas não se multiplicam.

Nenhum *Trypanosoma* apresenta no mamífero uma evolução morfológicamente e ecológicamente identica á de *Schizotrypanum*.

S. cruzi aproxima-se dos tripanosomas patogenicos pela morfologia da fórma sanguicola e pela virulencia ás vezes mortal para o homem e diversos animais; deles se afasta entretanto pela evolução no inséto,

Alguns caractéres biologicos gerais de tres gêneros de Tripanosomideos de mamiferos.

Caractéres	Gen. *Leishmania*	Gen. *Schizotrypanum*	Gen. *Trypanosoma*	
			Grupo A	Grupo B
No VERTEBRADO				
1) Fórma mais avançada	leishmania	tripanosoma	tripanosoma	tripanosoma
Dimensão total média	3-4 μ diametro	Pequena: 20 μ	Grande: 25-70 μ	Pequena: 15-30 μ
Blefaroplasto	em bastão	Subterminal (muito grande)	Subterminal ou sub-central	Subterminal ou terminal
Extremidade posterior		Curta	Longa	Curta
2) Multiplicação				
Fórma proliferativa	leishmania	leishmania	critidia e tripanosoma	tripanosoma
Divisão	binaria	binaria	multipla e binaria	binaria
Localisação	tecidos	tecidos	sangue	sangue
3) Evolução	leishmania	leish. - crit. - tripanosoma	critidia-tripanosoma	tripanosoma
Localisação	intracelular	intra - e extracelular	extracelular	extracelular
4) Especificidade de hospedador	$\pm$ estrita	não estrita	estrita	não estrita
5) Patoginicidade	patogenico	patogenico	não patogenico	patogenico
No INVERTEBRADO				
Evolução	"anterior"	"posterior"	"posterior"	"anterior"
Fórma infectante	leptomonas	tripanosoma	tripanosoma	tripanosoma
Mecanismo de transmissão	inoculação	contaminação	contaminação	inoculação
Vectôres mais importantes	Flebótomos	Barbeiros	Pulgas, tabanideos *melophagus*	Glossinas, tabanideos
Especificidade de transmissor	estrita	não estrita	estrita	estrita
Na CULTURA				
Evolução	leptomonas	leish. - crit. - tripanosoma	(leish.) critidia-tripanosoma	(critidia)-tripanosoma

modo de transmissão e facil cultivabilidade, caractéres biológicos estes que são comuns aos tripanosomas não patogenicos. Em nenhum dos grupos de tripanosomas póde o *S. cruzi* ser rigorosamente incluido, deles se distinguindo facilmente seja por sua morfologia, seja por sua biologia.

O conjunto de caractéres próprios fundamenta perfeitamente a manutenção do gênero de Chagas, indicando-lhe como situação mais adequada, na classificação dos tripanosomideos de mamíferos, o logar intermediario entre *Leishmania* e *Trypanosoma*.

A separação do gênero *Schizotrypanum* é o melhor caso, quiçá o unico justificado, dentre as numerosas tentativas para o desmembramento de *Trypanosoma*. Ela se impõe como medida compreensiva e util para a coordenação dos membros da complexa familia dos tripanosomideos e se justifica á luz dos mais exigentes critérios sistematicos.

AGRADECIMENTO

Desejamos expressar nosso sincero reconhecimento ao Dr. Georges Clarebout, do Laboratorio de Léopoldville (Congo Belga), que durante sua permanencia no Rio de Janeiro fez-nos o grande obséquio de traduzir para o inglês este trabalho, ao mesmo tempo em que ofereceu as mais oportunas sugestões a propósito do têma em questão.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aragão, H. H.

1913. Notas sobre as schizogonias e gametogonias dos trypanosomas. Brasil Medico, **27** (27) : 271-272.

Brumpt, E.

1936. Précis de Parasitologie. 5.ª edição. Masson & Cie., Paris.

Brutsaert, P. & Henrard, C.

1938. L'hémoculture comme moyen auxiliaire de diagnostic de la maladie du sommeil. C. R. Soc. Biol., **127** (14) : 1469-1472.

Calkins, G. N.

1926. The Biology of the Protozoa. Philadelphia & New York, Lea & Febiger.

Carpano, M.

1932. Localisations du *Trypanosoma theileri* dans les organes internes des bovins. Son cycle évolutif. Ann. Parasit. hum. comp., **10** (4) : 305-322.

Chagas, C.

1909. Nova trypanosomiase humana. Estudos sobre a morphologia e o cyclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etio-

logico de nova entidade morbida do homem. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **1** (2) : 159-218.

CHAGAS, C., VILLELA, E. & ROCHA LIMA, H.

1929. Amerikanische Trypanosomenkrankheiten, Chagas Krankheit. *In* C. Mense, Handbuch der Tropenkrankheiten, 3.ª edição, **5** (2) : 673-728.

CHATTON, E. & COURRIER, R.

1921. Sur un trypanosome de la Chauve-souris, *Vesperugo pipistrellus*, a des formes crithidiennes intratissulaires et cystigènes. Hypothèse relative à l'étiologie du goître endemique. C. R. Acad. Sciences, **172** (20) : 1254-1257.

1921 *a*. Un *Schizotrypanum* chez les Chauvés souris *(Vesperugo pipistrellus)* en Basse Alsace. Schizotrypanose et goître endemique. C. R. Soc. Biol., **84** (18) : 943-946.

CRAIG, C. F.

1926. Manual of parasitic Protõzoa of Man. Philadelphia & London

CRAIG, C. F. & FAUST, E. C.

1937. Clinical Parasitology. Lea.

CUNHA, A. M. DA

1923. Doença de Chagas. O *Schizotrypanum cruzi* e a sua transmissão. A Folha Medica, **4** (10) : 17.

CUNHA, A. M. DA & DIAS, E.

1939. Reacção de fixação do complemento nas leishmanióses. Brasil Medico, **53** (5) : 89-92.

DELANOE, P.

1912. Sur les rélations des kystes de Carini du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. C. R. Acad. Sciences, **155** : 658.

DIAS, E.

1933. Sobre um *Schizotrypanum* de um morcêgo do Brasil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **27** (2) : 139-146 (in Portuguese and English).

1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **28** (1) : 1-111.

1934 *a*. *Trypanosoma cruzi* ou *Schizotrypanum cruzi*? Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **29** (1) : 203-227 (in Portuguese and French).

1936. Revisão geral dos Hemoflagellados de Chirópteros. IX Reunión de la Soc. Argentina de Patologia Regional, Mendoza, **1** : 10-88.

FRANCHINI, G.

1921. Trypanosome de la Chauve-souris en Italie. Formes viscérales et stades de dévelopment chez un acarien gamaside, le *Leiognathus laverani* n. sp. Bull. Soc. Pathologie Exotique, **14** (9) : 542-546.

HARTMAN, M.

1910. Notiz über eine weitere Art des Schizogonie bei *Schizotrypanum cruzi*. Arch. f. Protistenkunde, **20** : 361.

HARTMAN, M. & SCHILLING, C.

1917. Die pathogenen Protozoen. Berlin.

HOARE, C. A.

1934. (*Referatum* E. Dias, 1934). Trop. Dis. Bull., **31** : 597.

1934 *a*. The transmission of Chagas' disease. A critical review. Trop. Dis. Bull., **31** (11) : 757-762.

1935. (*Referatum* E. Dias, 1934 *a*). Trop. Dis. Bull., **32** (10) : 722.

1936. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. I. The method of reproduction in its bearing upon classification, with special reference to the *lewisi* group. Parasitology, **28** (1) : 98-109.

1938. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. V. The diagnostic value of the kinetoplast. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **32** (3) : 333-342.

HOARE, C. A. & COUTELEN, F.

1933. Essai de classification des trypanosomes des mammiferes et de l'homme basée sur leurs caractères morphologiques et biologiques. Ann. paras. hum. comp., **11** : 196.

HOEPPLI R. & REGENDANZ, P.

1930. Beiträge zur Pathogenese und Histopathologie der Trypanosomeninfektionen der Tiere. (I) — Arch. f. Schiffs. — u. Tropenhyg., **34** (1) : 1-18.

IRIARTE, D. R.

1936. Contribución al estudio de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Gaceta Medica, Caracas, **43** (10) : 149-159.

KUDICKE, R.

1930. Die Blutprotozoen und ihre nächsten Verwandten. *In* C. Mense, Handb. der Tropenkrankheiten, 3.ª ed., **5** (2) : 847.

LE DANTEC, A.

1924. Précis de Pathologie Exotique, 4.ª edição, Paris.

MANTEUFEL, P. & TAUTE, M.

1930. Der amerikanische Trypanose des Menschen. *In* Kole & Wassermann's Handb. der pathogenen Mikroorganismen, 3.ª ed., **7** (2) : 1267-1291.

MARCHOUX, M.

1934. Notice nécrologique sur Carlos Chagas (de Rio de Janeiro). Bull. Acad. Médecine, **112** (41) : 786-792.

MAYER, M.

1920. Pathogenen Protozoen. *In* Prowazek's Handbuch der pathogenen Protozoen, **2** : 881.

MAYER, M. & ROCHA LIMA, H.

1914. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* im Warmblütern und Arthropoden. Arch. f. Schiffs.-u. Tropenhyg., **18** : 257.

MINCHIN, E. A.

1912. An introduction to the study of the Protozoa. London.

MESNIL, F.

1938. (*Referatum* E. Dias, 1934 *a*). Bull. Inst. Pasteur, **36** (22) : 1192.

NAEGLER, K.

1913. Experimentelle Studien über die Passage von *Schizotrypanum cruzi* Chagas durch einheimische Tiere. Centralbl. f. Bakteriol., Orig., **71** : 202.

NINO, F. L.

1929. Contribución al estudio de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. Tésis de doctorado. Universidad de Buenos Aires.

NÖLLER, W.

1930. Allgemeines über Trypanosomen und Trypanosomen krankheiten. *In* Kolle & Wassermann's Handb. der pathogenen Mikroorganismen, 3.ª ed., **7** (2) : 1079-1138.

PERUZZI, M.

1928. Les trypanosomes dans les lésions, les localisations massives et les invasions céllulaires. Rapport final de la Société des Nations pour l'étude de la Trypanosomiase humaine, 289. Génève.

REICHENOW, E.

1928. Doflein u. Reichenow's Lehrbuch der Protozoenkunde, 5.ª ed., Jena.

REGENDANZ, P. & HOEPPLI, R.

1929. Die Einwanderung der Trypanosomen in das Gewebe und die dadurch bewirkten histopathologischen Veränderungen. Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg., **33** (7) : 376-387.

RODHAIN, J.

1928. (*In* Schwetz & Fornara, 1928, discussion, p. 323).

SCHWETZ, J.

1928. Un stade leishmanioide dans l'évolution du *Tr. vivax-cazalboui* et du *Tr. congolense-dimorphon* chez l'hôte vertébré (bovidés). Ann. Soc. Belge Med. Trop., **8** : 315.

SCHWETZ, J. & FORNARA, L.

1928. Notes d'histologie pathologique sur le *Trypanosoma dimorphon-congolense*. Idem, **8** : 319.

1929. Y a-t-il des formes d'évolution des trypanosomes chez l'hôte vertébré? Bull. Soc. Pathologie Exotique, **22** (9) : 862-871.

STILES, C. W.

1936. Comunicação pessoal.

SWARTZWELDER, J. C.

1938. Consideration of the classification of Trypanosomes, with special

reference to the classification of Jacono. Jour. Trop. Med. and Hyg., **41** (11) : 182-187.

VIANA, G.

1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da molestia de Carlos Chagas. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **3** (2) : 276-294.

VILLELA, E. & DIAS, E.

1934. Sur la formation d'ulcérations chez les animaux infectés par le *Schizotrypanum cruzi*. C. R. Soc. Biol., **117** (30) : 394-396.

WENYON, C. M.

Protozoology, **1**. London.

WHITAKER, B. G.

1937. Comunicação pessoal.

The genus Schizotrypanum Chagas, 1909

by

Emmanuel Dias

Contents Page.

Introduction 213
History 214
Evolution and Multiplication in the Vertebrate .. 215
Morphology and ecology 217
Invasion of the tissues by *Trypanosoma* 218
Division forms of *Schizotrypanum* in the blood .. 221
Multiplication of *Schizotrypanum* of bats 222
Continuous or Discontinuous Multiplication 223
Position in the Classification 223
Summary and Conclusion 226
References 207

INTRODUCTION

The genus *Schizotrypanum* was created by C. Chagas in 1909 for the etiological agent of American trypanosomiasis, which was at the start included in the genus *Trypanosoma*. After having been denied by Chagas himself (Chagas 1911) it was incorporated into the systematics either as a synonymous of *Trypanosoma*, or as an autonomous and valid genus, or else as being relegated to the sub-generic category. The question had not been duly debated and a definite unanimous opinion was not come to, and the authors remained divided on those various opinions.

A short time ago it looked as if the problem was about to find a solution as the partisans of opposite opinions endeavoured clearly to define their own points of view, while analysing and discussing at the same time the data on the other side.

The question was argued mainly by Dias (1934*a*), with a view of keeping *Schizotrypanum* in an independent status, and by Hoare (1936) who does not admit its separation from the genus *Trypanosoma*.

In the present paper, we intend to review the whole question, chiefly aiming at a critical analysis of Hoare's arguments[1] for the defense of his opinion.

[1] All quotations from this author without references to dates, refer to Hoare (1936).

HISTORY

Trypanosoma cruzi Chagas, 1909, was the first name given to the parasite, but later the genus *Schizotrypanum* Chagas, 1909, was created for it, the appelation being based on the grounds of the supposed existence of a « schizogonic multiplication » in the animal organism. However, as several investigators believed to have established in true trypanosomes an analogous process of proliferation, Chagas (1911, p. 275) was naturally led to conclude that « muss offenbar das Genus *Schizotrypanum* verschwinden und der Parasit wiederum wie ursprünglich *Trypanosoma cruzi* heissen. » But then Hartmann (1910), and Vianna (1911) discovered the intracellular leishmanial forms, the real multiplication forms of the flagellate, it being shortly afterwards proved that the so called « schizogonic forms » were nothing but evolutive forms of other protozoa (Delanoe 1912, Aragão 1913). Consequently, on account of these discordances and contradictions which preceeded the exact knowledge of the cycle of the parasite, authors differed in opinion as to the nomenclature and the systematic position of the etiological agent of Chagas' disease.

The authors opining against the maintaining of the genus, chiefly argued that since the « schizogonic multiplication » which has been advanced as its main characteristic, was false, the name *Schizotrypanum* could no longer be kept. While Chagas (1911) reverted because schizogony was no longer specific to *Schizotrypanum*, they were stopped at the same point, because schizogony had been proved not to exist. Among the authors who do not accept the genus are Wenyon (1926, p. 481, 487), Hoare (1934, 1934*a*, 1935, 1936), Brumpt (1936, p. 339), Craig & Faust (1937, p. 151).

Those who defend the genus *Schizotrypanum* do not base it any longer on the primitive characters — but well on new ones, especially on the true process of multiplication in the vertebrate. Chagas himself reached this conviction later, so much so, that in referring to the binary fission of the leishmanias of *S. cruzi*, he said: « Dieses ist eine nur bei diesem Trypanosom vorkommende biologische Eigenschaft, sodass vielleicht die Bildung einer neuen Gattung *Schizotrypanum* für diesen Parasiten gerechfertigt erscheint » (Chagas, Villela & Rocha Lima 1928, p. 679). This point of view is adhered to by the majority of the authors who have written on the subject: Mayer & Rocha Lima (1914, p. 109), Hartmann & Schilling (1917, p. 176), Mayer (1920, p. 895), Da Cunha (1923, p. 19), Le Dantec (1924, p. 559), Craig (1926, p. 276), Calkins (1926, p. 383-384), Reichenow (1928, p. 603), Niño (1929, p. 12), Kudicke (1930, p. 863),

Nöller (1930, p. 1120), Manteufel & Taute (1930, p. 1268), Dias (1934*a*), Marchoux (1931), Iriarte (1936), Stiles (1936), Whitaker (1937), Mesnil (1938), Swartzwelder (1938), etc.

In a previous paper (Dias 1934*a*), it has been pointed out that the inseparability of the genus by the mere allegation that its initial basis was false, could not be justified. As a matter of fact, a similar argument was afterwards not used again, even by authors who stayed in the same « *status quo ante* 1911, when Chagas himself reverted . . . to the original name *Trypanosoma cruzi* » (Hoare, p. 99). Therefore, in present conditions, we may consider as demonstrated that: « Le fait que le genre de Chagas ait été basé sur l'existence d'une multiplication schizogonique, et encore moins que son auteur l'ait rejeté à la suite d'observations erronées d'autres auteurs, n'empêchent nullement que, dès l'instant ou d'autres propriétés biologiques sont connues, qui en permettent la caractérisation, ce genre soit maintenu » (Dias 1934*a*, p. 219).

The value of these other biological properties needs further discussion and so do the criticisms which have been opposed. This we shall try to do in agreement with arguments taken from the accumulated exact knowledge of the biology of the Trypanosomidae.

EVOLUTION AND MULTIPLICATION IN THE VERTEBRATE

According to Dias (1934*a*, p. 218): « Tous les auteurs sont d'accord sur ce point que la multiplication du *S. cruzi* s'effectue d'une manière complètement différente de celle qui est commune aux autres trypanosomes. Tandis que ceux-ci se reproduisent dans le sang, en général par division binaire et sous la forme de trypanosome, le *S. cruzi* se reproduit dans les tissus, en situation intracellulaire, sous l'aspect d'éléments arrondis, dépourvus de flagelle (leishmania), et ce n'est qu'exceptionellement que l'on trouve, dans le sang circulant, des trypanosomes avec des signes plus ou moins définis de division. L'absence de multiplication dans le sang périphérique à la manière des autres trypanosomes, et l'existence d'une phase intracellulaire d'évolution et de multiplication, constituent la caractéristique biologique principale, et par là, la principale raison de reconnaître les parasites qui possèdent cette caractéristique, comme formant un groupe ou genre à part, distinct de cellui des véritables trypanosomes. »

So then the main characteristic of *Schizotrypanum* is constituted by morphological and by ecological elements in connection with the form and the place where the division takes place, and presupposes two simultaneous and inseparable orders of facts: a positive one, the multi-

plication of leihsmania in the tissues, and a negative one, the absence of typical division of blood trypanosomes. It is obvious therefore, that a similar characteristic will only be exhibited by the flagellates which assume in the vertebrate the morphological aspects referred to and present both the orders of mentioned facts. Therefore, by definition, are excluded from the genus all mammalian parasites which, though being able occasionally to assume the leishmanial form in the organs, *normally divide in the trypanosome form in the host's blood* (*T. brucei*, *T. rhodesiense* etc.) as well as those which usually do not multiply in the trypanosome form, but in which *the intracellular leishmanial forms are always lacking* (*T. lewisi*, *T. rabinowitschi* etc.).

These considerations invalidate Hoare's main objections to the principal characteristic of the genus. He first intends breaking up that characteristic into two items: 1) a « biological » or rather, an « ecological » one and 2) a « morphological » one, with a view of deducting that the « ecological » argument was advanced as « principal ». Indeed, *S. cruzi* undergoing « evolution and multiplication » in the tissues does not only represent an ecological fact; the term « evolution » naturally alludes to the succession of definite morphological stages, and the morphological fact of the characteristic evolution is, in this case, not separable from the ecological one.

Hoare himself has admitted that « On the grounds that *S. cruzi*, in the course of its development in the vertebrate, « assume alternativement les caractéristiques morphologiques des genres *Leishmania* et *Trypanosoma* », Dias (1934*a*, p. 224 *et seq.*) assigns to *Schizotrypanum* an intermediate position between the two last-named genera » (p. 100). But the morphological bases are neglected by him when, in opposing the « ecological criterion », he states: « there can be no justification for the separation of morphologically similar organisms on the grounds of difference in habitat » (Hoare, p. 101) — moreover we do not believe that « morphologically similar organisms » can apply to *S. cruzi* on the one side and to the trypanosomes, especially those of the group A, on the other. Should it be admitted that greater importance has been attached to the biological characteristics, even the real morphological grounds on which Chagas' genus is based must not be forgotten: « it is a generally recognized principle, both in zoology and in botany, that the essential criterion in the constitution of a systematic unit is the morphology of the organisms, the classification of which is based on the difference of structural characters between them » (Hoare, p. 101).

MORPHOLOGY AND ECOLOGY

No species of *Trypanosoma* presents morphological characters identical to those of *Schizotrypanum*. The flagellates of the latter genus have an adult form of trypanosome thoroughly peculiar, characterized by the dimensions of the body, the size and position of the blepharoplast; and just as typical is the series of evolutive stages through which they pass inside of the animal cels. The blood forms can easily be distinguished from those of true trypanosomes, specially from the large forms of Hoare' and Coutelen's (1933) *lewisi* group. On these differences we have been able to base our classification of bat's hemoflagellates into two groups, viz. group « *verpertilionis* » (or « *cruzi* ») and group « *megadermae* » (Dias, 1936). The voluminous blepharoplast in subterminal or sometimes in terminal, but never in subcentral position, is a structural element of the greatest importance to recognise the « very characteristic appearance » (Wenyon 1926, p. 490) of the trypanosome forms of *S. cruzi*. The distinction of these forms from the forms of *T. lewisi* and from the gigantic trypanosomes of group A is very easy indeed, easier than the distinction to be made from the blood forms of *T. vivax* and other trypanosomes of group B (cf. Hoare 1938, fig. p. 337).

In the genus *Trypanosoma*, when cyclic morphological changes occur in the vertebrate's organism, they mostly take place in free blood parasites. This is true for all mammalian trypanosomes except perhaps *T. theileri* of cattle, if Carpano's (1932) observations be right. Anyhow, this parasite as well as some trypanosomes of cold-blooded animals, which seem to pass through an intracellular stage (e. g. *T. inopinatum* of frog), are morphologically very different from *Schizotrypanum*, and consequently are not to be included in this genus, for this generic name only « should be adopted for trypanosomes answering in morphology and life-history to the type species, *Schizotrypanum cruzi* » (Craig 1926, p. 276).

Again from a strictly ecological point of view, *Schizotrypanum* evolution in the vertebrate host is characteristic; it largely and necessarily occurs in the « fixed » tissues, trypanosomes being as a rule the only elements free in the circulation.

The necessary occurrence of that intracellular phase, even all structural variations taking place therein being kept apart, constitutes a biological or an ecological argument of very considerable value in favour of an independent genus *Schizotrypanum*. The essential intracellular element is the leishmania form, which at the given moment is the reproductive and the latent element, which accounts for the long duration of the infection.

So indispensable is this phase that one may postulate: *without leishmanial stage there can be no infection by S. cruzi*, or: *without intracellular multiplication no infection by S. cruzi is possible* — it being immaterial to choose the morphological or the ecological language to express the same idea.

Insisting further on his argument against the « ecological character », Hoare (p. 101) declares that a differentiation between *Schizotrypanum* and *Trypanosoma*, based on the multiplication of the former in the tissues and of the latter in the blood, is fallacious, « since histologically blood represents merely a variety of connective tissue in which the intercellular substance is liquid, while its constituent elements are genetically closely related to those of the reticulo-endothelial system, for which *Schizotrypanum cruzi* shows a particular predilection. » We consider as a matter of great importance, the distinction to be made between phenomena essentially of the same nature (multiplication), but occurring on the one side in free parasites in the blood (*Trypanosoma*) and on the other side in parasites necessarily intracellular (*Schizotrypanum*), all the more so that in this location the flagellates are undergoing important structural changes. The fact that blood is merely a variety of connective tissue with a liquid intercellular substance and cells genetically closely related to those of the reticulo-endothelial system, does not seem to have the slightest relation to the question of systematics here considered.

As a matter of fact, an ecological argument was good enough to separate not only genera, but even families of other protozoa, as was the case in the classification of Haemosporidiidea into parasites which complete their whole cycle in the blood (Plasmodiidae), and parasites whose cycle partly occurs in the tissues and partly in the blood (Haemoproteidae).

INVASION OF THE TISSUES BY TRYPANOSOMA

For many years past, observers have been preoccupied with the possibility of an evolutive cycle of trypanosomes occurring in tissues of infected animals. The famous question of « latent bodies » was open at a date previous to Chagas' discovery. However, it is since the observations of Chagas (1909), Hartmann (1910) and Vianna (1911) on *S. cruzi*, that the authors more particularly endeavoured to investigate the existence of intracellular or intratissular forms in the endogenous evolution of true trypanosomes.

In many species, rounded corpuscles (latent bodies) were de-

scribed, and these, made up in arbitrary series with other more or less distinctive forms, gave the appearance of some evolutive cycle (cf. Wenyon 1926, p. 332-333). Numerous also were the species in which pseudo-forms of schizogonic multiplication, similar to those which Chagas (1909) initially described in *S. cruzi* infections (cf. Dias 1934*a*, p. 217-218), have been reported.

« Schizogonic forms » as well as « latent bodies » were finally known to be the consequence of wrong interpretations: the latter are nothing but trypanosomes in a state of more or less advanced degeneration, while the former are simply evolutive forms of other protozoa erroneously included in the cycle of flagellates.

Numerous investigations have duly proved that up to now no evidence whatever exists of an intracellular cyclic evolution, similar to that of *Schizotrypanum*, taking place in any mammalian trypanosome. Therefore, it may be considered as an ascertained fact that: « The genus *Schizotrypanum* Chagas differs from *Trypanosoma* in having an intracellular leishmania phase in the tissues of the vertebrate (Calkins 1926, p. 383) — with the only doubtful exception of *T. theileri*, as far as mammalian trypanosomes are concerned.

Nevertheless, Hoare (p. 101) maintains that « the histotropism of *S. cruzi* is by no means exceptional, since other trypanosomes also occur regularly and are capable of multiplication in the « fixed tissues » — and therefrom draws the conclusion that « the difference in this respect between the latter species (*S. cruzi*) and others, being only of degree, merely emphasizes their close relationship » (p. 102).

In order to strengthen this conclusion, based on the «common occurrence » of the invasion of tissues by trypanosomes, Hoare refers to the papers of Peruzzi (1928), Hoeppli & Regendanz (1930), Schwetz (1928), and Schwetz & Fornara (1928, 1929). These papers however, demonstrate that such tissue forms « n'ont pas du tout la même signification que dans le *Schizotrypanum* » (Dias 1934*a*, p. 220), since they are not cyclic evolutive forms.

As a matter of fact, the forms observed by Peruzzi (1928) in infections by *T. gambiense*, *T. rhodesiense* and *T. brucei* were not looked upon by him as true forms of intracellular evolution, although they might well result from multiplication *in situ*: « Ces manifestations d'invasion cellulaire ont des caractères qui révèlent des rapports contractés accidentellement avec le protoplasme altéré, ou vacuolisé par un processus régressif, et ils ne présentent pas les phases d'une évolution cyclique intracellulaire propres à d'autres trypanosomes » (Peruzzi 1928, p. 293).

Referring to Peruzzi's findings on cellular invasion by trypanosomes, Hoare (p. 101) states that « These findings and conclusions were later fully confirmed by Hoeppli and Regendanz (1930) ». Indeed, these authors reported *Leishmania ähnlichen* parasites in the tissues of infected animals, but the degenerative character of such forms was emphasized: « es sich hierbei um Involutionsformen der Trypanosomen handelt » (Hoeppli & Regendanz 1930, p. 11).

In a previous paper by Regendanz and Hoeppli (1929, p. 384) the same interpretation was given, not only of the forms they observed themselves, but also of those which Peruzzi (1928), and Schwetz & Fornara (1928) had precisely referred to: « Aenliche abgerundete Formen haben auch Peruzzi bei mit *Trypanosoma gambiense* und mit *Trypanosoma rhodesiense* infizierten Affen und Schwetz und Fornara bei mit *Trypanosoma congolense* infizierten Rindern gefunden. Während der erste sie für Involutionsformen hält, neigen die beiden anderen Autoren zu der Ansicht, dass es sich um Dauerformen der Trypanosomen handle, die sich wieder in Flagellatenformen umwandeln können. Es ahnelt sich hier wohl um die früher als « latent bodies » beschriebenen Formen. Wir konnten bisher in unseren zahlreichen Untersuchungen keine Anhaltspunkt dafür finden, dass es sich bei den runden Formen um Evolutions- oder Dauerformen handelt. »

In discussing the paper by Schwetz & Fornara (1928), Rodhain (1928) expressed a similar opinion on the tissue forms described by these authors in *T. vivax* and *T. congolense* infections: « L'examen des coupes et des dessins que les auteurs ont joints à leur travail m'inclinent à croire que les formes « leishmania » qu'ils ont observées sont plutôt des formes d'involution et non d'évolution. »

All these papers were called upon to confirm Hoare's assertion that « invasion of the « fixed » tissues by trypanosomes and their multiplication in the leishmanial stage are found quite commonly in trypanosomes, and are not limited to *S. cruzi* » (p. 102); and on this assertion it was concluded that « the fact that other trypanosomes are capable of multiplication in the leishmanial stage deprives this character of any generic value » (Hoare, p. 107) — in spite of the fact that this « leishmanial stage » of pathogenic trypanosomes is probably, if not surely, mere *latent bodies* of a degenerative nature.

The « close relationship » between the pathogenic trypanosomes and *Schizotrypanum cruzi* cannot be established on the grounds of multiplicative stages in the vertebrate's host, since 1) the NORMAL method of multiplication of the pathogenic trypanosomes is that of binary fission of trypanosome forms in the blood, and 2) the rounded forms of patho-

genic trypanosomes in the animal's organs are NOT NORMAL evolutive forms, but rather inconstant and involutive ones.

The proper conclusion which arises from what has been said is that the process of multiplication of *Schizotrypanum* in the vertebrate constitutes a first class character, at the same time morphological and ecological, for the individualization of the genus.

DIVISION FORMS OF SCHIZOTRYPANUM IN THE BLOOD

The normal process of multiplication of *S. cruzi* in the vertebrate's organism is that of binary fission of the leishmania intracelular forms. The crithidia forms may still multiply, but the adult trypanosome forms are not susceptible to division: « Longitudinally dividing forms of *T. cruzi*, such as are found in the blood in the case of other trypanosome infections, do not occur » . . . (Wenyon 1926, p. 490).

The scanty observations tending to show a common occurrence of division of *S. cruzi* in the blood are due to erroneous interpretations. On account of the fragility of trypanosome forms, deformations are frequent which sometimes may suggest binary fission. So, the very common mechanical alterations of the blepharoplast in fixed blood films, although nearly always limited to this corpuscle, have been falsely interpreted as incipient division forms, in spite of the fact that the rest of the parasite's body is usually undivided; and so have been mistaken even distorted trypanosomes observed in coarse thick-drop preparations. The blood trypanosomes can also be injured during the intercurrence of bacterial infections, as has been reported by Niño (1929, p. 602): « en algunas sangres de animales muy parasitados y que sufrieron infecciónes graves y mortales he observado algunos tripanosomas en vía de destrucción y que podrían erroneamente hacer pensar en processos de división longitudinal. »

Very rarely indeed can be found in the blood, trypanosomes of *S. cruzi* apparently showing signs of division; such exceptional forms were interpreted as immature parasites, undergoing a transformation into trypanosomes while still dividing (Dias 1934, p. 15, fig. 1). However, « La signification du rare fait que l'on trouve des formes adultes du *S. cruzi* présentant l'apparence de division dans le sang, reste encore obscure, bien qu'il y ait des hypothèses qui tendent à l'expliquer » (Dias 1934*a*, p. 220). Hoare himself (p. 106) regards such forms as « unimportant stages, the significance of which in the life-cycle is not established. »

As a matter of fact, practically all the investigators refuse to

admit the multiplication of *S. cruzi* under the trypanosome form, so that Mayer and Rocha Lima's statement (1914, p. 109, in opposition to Nägler, 1913) may still be recollected: « Weitgehende Teilungen haben wir in Uebereinstimmung mit Chagas u. a. nicht beobachten können. »

Nevertheless, Hoare (p. 102) disregards this legitimate character of the genus: « binary fission of the trypanosome forms of *S. cruzi* in the blood — the absence of which in this trypanosome was advanced as a differential character — occurs more commonly than has been previously assumed (Dias 1934, 1934*a*) ».

This assertion does not only contradict the admitted truth, but firmly opposes Hoare's own reiterated statements that division of *S. cruzi* and other parasites under the trypanosome form « appears to be a rare phenomenon » (p. 105); that « such dividing forms are rarely encountered » (p. 105); that division occurs « exceptionally in the trypanosome stage » (p. 108); and that « reproduction . . . never takes place in the trypanosome stage » (p. 105). Those very positive affirmations should have prevented the author from stating: « as regards the other differential character of *Schizotrypanum*, viz. the absence of division in the trypanosome forms of blood, it has also been shown to be without foundation » (Hoare, p. 107).

MULTIPLICATION OF SCHIZOTRYPANUM OF BATS

The process of proliferation of *Trypanosoma vespertilionis* and other morphologically similar parasites of Cheiroptera, remained unknown until Chatton & Courrier (1921, 1921*a*) described in the organs of *Vesperugo pipistrellus*, « intratissular » cysts composed of crithidial flagellates. The authors took advantage of this finding to include the parasite in the genus *Schizotrypanum*, under the name *Schizotrypanum pipistrelli*.

The crithidial cysts of Chatton & Courrier, however, could never again be found. In the organs of infected bats of the same species, Franchini (1922) could only find multiplicative leishmanial forms, emphasizing that « Jamais nous n'avons vu dans les organes des formes crithidiennes » (p. 544). In Brazilian bats (*Phyllostomus hastatus*) only intracellular cysts constituted by leishmanial forms could be detected (Dias 1933, 1936). Of course crithidial forms do exist, but just as a transition stage to trypanosome, as in *S. cruzi*.

On the grounds of Chatton & Courrier's findings only, Hoare (p. 102) argues that the essential character of proliferation in the leishmanial stage is lacking in *S. pipistrelli*, « *for it reproduces not in the leish-*

manial stage, but in the form of a crithidia » . . . , so it would be necessary either to remove this flagellate from the genus *Schizotrypanum*, or to modify the definition of this genus. But neither of these alternatives should be adhered to, since it has been already demonstrated that these flagellates divide under the leishmanial form.

CONTINUOUS OR DISCONTINUOUS MULTIPLICATION

In infections by rodent trypanosomes, the proliferation of parasites is « discontinuous » ; it only occurs during a limited multiplicative phase lasting but a short time, sometimes only one day (*T. rabinowitschi*). Hoare places *S. cruzi* among the trypanosomes of the *lewisi* group and attributes to it this common characteristic.

However, the multiplication of *Schizotrypanum* is not restricted to any limited periods; it is « continuous », as is the case in infections by the pathogenic trypanosomes. If it be true that in this latter group, « multiplication is not restricted to any special period, but is continuous, proceeding without interruption throughout the entire course of the infection » (Hoare, p. 105), this is also true in *Schizotrypanum* infections, except for the difference that here multiplication takes place in the tissues, in the leishmanial stage, whereas in the pathogenic trypanosomes it occurs in the blood, in the trypanosome form itself [2].

POSITION IN THE CLASSIFICATION

« On the grounds that *S. cruzi*, in the course of its development in the vertebrate, « assume alternativement les caractéristiques morphologiques des genres *Leishmania* et *Trypanosoma* », Dias . . . assigns to *Schizotrypanum* an intermediate position between the two last-named genera » (Hoare, p. 100).

As a matter of fact, the obvious structural analogies of the latter genus with both *Leishmania* and *Trypanosoma*, point out that its most adequate place in the classification be the intermediate one: during its multiplicative and the « latent » period, *Schizotrypanum* is morphologically and ecologically a leishmania, and in its blood stage it is a trypanosome.

---

[2] In a previous paper (Dias 1934a) we have referred in a general way to the multiplication of Trypanosomes in the blood, without going into details as to the form under which in takes place, these forms being quite different from those of *S. cruzi*. Again, in our key of classification: "la multiplication se fait dans le sang, *généralement* sous la forme de trypanosome ' [p. 225]. So our statement is not an "also entirely misleading" one [Hoare p. 102] since we did not pretend that all trypanosomes divide in the blood *only* under the trypanosome form.

As an intermediate genus, *Schizotrypanum* may take place in a key with any of the two other genera, according to the criterion adopted, be it based on the morphology either of the intracellular leishmanial or of the blood trypanosome form. In a previous classification (Dias 1934*a*) the first criterion was adopted, and this led Hoare (p. 100) to state: « the new classification . . . introduces radical changes in our conceptions of the Trypanosomidae as a whole, for it not only recognizes the independent status of *Schizotrypanum*, but widens the gap between this genus and *Trypanosoma* still further by uniting it with *Leishmania* into a group placed in opposition to *Trypanosoma*. »

Many authors have, since long ago, pointed out the theoretical interest of those flagellates which, in the vertebrate, alternately are a leishmania and a trypanosome. According to Minchin (1912, p. 296): « The intracellular multiplication recalls strongly that of the parasite of kala-azar. *Schizotrypanum* thus forms an important link between a typical blood-trypanosome, such as *T. lewisi*, and a tissue parasite, such as the species of *Leishmania*. » Hartmann & Schilling (1917, p. 176) think the same way: « Die Gattung *Schizotrypanum* erscheint in dieser Beziehung gewissermassen als eine Zwischenglied zwischen *Trypanosoma* und *Leishmania*, indem sie zwar im Blutserum als typisches Flagellat auftritt, die Vermehrung aber in ähnlicher Weise wie *Leishmania* vor sich geht. » « Die Verbindung der Gattung *Leishmania* mit den übrigen Blutflagellaten dürfte durch die neueste Befunde . . . gegeben sein, die bei *Schizotrypanum* in dem Körper der Versuchstiere Stadien dieses Trypanosomas fanden, die von *Leishmania* nicht zu unterscheiden sind » (idem, p. 244). According to Kudicke (1930, p. 896): « *Schizotrypanum* zeigt im Wirbeltier im begeisselten Stadium eine typische aber nicht direkt teilungsfähige Trypanosomaform und ähnelt den echten Trypanosomen auch in der Entwiecklung im Uberträger. Es unterscheidet sich von ihnen durch das regelmässig Vorkommen geisselloser intrazellulärer Stadien im Wirbeltier, durch die es sich der Gattung *Leishmania* nähert. »

« En résumé, le *S. cruzi* est morphologiquement un trypanosome et génétiquement une *Leishmania*. Ce mode de réproduction particulier suffit amplement à séparer ces protozoaires des trypanosomes ». (Le Dantec 1924, p. 559).

Besides the similar morphology of the division forms, there are also biological characters which genus *Schizotrypanum* and genus *Leishmania* have in common. Ecologically, division forms are intracellular and electively located in cells of the reticulo-endothelial system. From a pathological point of view, both leishmaniases and schizotrypanosis essentially affect this system, and on account of the ulcerative process

which occasionally occurs in *S. cruzi* infections it has been stated that « Ces faits montrent une fois de plus les analogies entre le *S. cruzi* et les Leishmania » (Villela & Dias, 1934).

And serologically, positive complement fixation reactions were performed in leishmania infections with *S. cruzi* antigens, and *vice versa*, positive results were obtained in *S. cruzi* infection with *Leishmania* antigens (cf. Da Cunha & Dias, 1939).

On the other hand, the biological relationship of *Schizotrypanum* with the flagellates of genus *Trypanosoma* is evident and concerns the trypanosomes which like itself, are transmitted by contamination (group A), as well as the pathogenic trypanosomes transmitted by inoculation (group B).

If Chagas' genus were not to be accepted, where should be classified either that pathogenic trypanosome which is transmitted by contamination and multiplies like a true leishmania, or that leishmania which appears in the blood as a trypanosome?

If the criterion of the morphology of blood trypanosomes be strictly taken into account, then *Schizotryapnum* should rather figure among the flagellates of group B, on behalf of its size, the position and dimension of the blepharoplast and the short posterior end. The ability of *S. cruzi* to infect man and many animals, often causing fatal infections, also requires that it should take place among the pathogenic trypanosomes of Group B, rather than among the non-pathogenic forms of group A. But on other biological grounds, *Schizotrypanum*'s position in group B cannot be justified, as it is transmitted by contamination and develops in the hind-gut of the invertebrate.

On the other hand, *Schizotrypanum*'s location in group A is no better. *Schizotrypanum* and trypanosomes of this group have in common biological features such as « posterior station » development in the insect, contaminative mechanism of transmission and easy culturability (the latter apparently is no longer a strict privilege of non-pathogenic Trypanosomes, since experiments tend to prove that culture — hemoculture — can be used as a means of diagnosis of gambian sleeping-sickness — cf. Brutsaert & Henrard, 1938); but the morphology of the blood forms and the evolution (leishmanial intracellular stage) of *Schizotrypanum* in the vertebrate are not consistent with the morphology and the evolution of the members of section A. The above mentionned biological characters must not be overestimated to the extent of mixing up in one and the same group, forms as different as *T. lewisi*, *T. melophagium*, *T. theileri*, *T. ingens*, « *T. cruzi* » ...

A group morphologically so heterogeneous as Hoare and Coutelen's (1933) *lewisi* group, could not possibly be gathered in a classification which would be based « entirely in the morphology of the trypanosomes, the biological features adduced being only subsidiary characteristics » (Hoare, p. 108).

Considering the whole endogenous cycle of *Schizotrypanum*, it is evident that its morphological characters in the adult flagellate stage are more closely related to those of the pathogenic trypanosomes, while in the intracellular multiplicative stage they approximate those of parasites belonging to the genus *Leishmania*; structural analogies with members of that *lewisi* group are far more remote in both stages. The statement that « the morphology of the trypanosomes, the stages of development, and method of reproduction of these two species (*S. cruzi*, *S. pipistrelli*) in the vertebrate host are of the same type as in members of the *lewisi* group » (Hoare, p. 107) cannot possibly be maintained.

The attached table, summarizing the main biological and morphological characters of the genera of trypanosomidae illustrates that if genus *Schizotrypanum* has common features with *Leishmania* and *Trypanosoma*, the combination of all its own characteristics cannot but build it up as an intermediate autonomous genus, easily distinguishable from the other mammalian flagellates.

SUMMARY AND CONCLUSION

In the present paper, the characteristics of the genus *Schizotrypanum* were analyzed and their relationship to those of other digenetic flagellates considered. It is to be believed that proper evidence has been brought forward to establish that genus on a firm basis.

Schizotrypanum has peculiar morphological characters which assimilate it to *Leishmania* in the intracellular period and to *Trypanosoma* in the blood stage. Flagellates belonging to that genus are characterized not only by the morphology of the trypanosome form, but also by the evolution in the vertebrate's organism. In *S. cruzi*, as in *S. pipistrelli*, multiplication takes place in the tissues by binary division of the intracellular leishmania forms; the blood trypanosomes do not multiply. *Trypanosoma* never presents in the mammalian host an evolution morphologically and ecologically identical to that of *Schizotrypanum*. *S. cruzi* is rather like the pathogenic trypanosomes by the morphology of the blood form and by its virulence, often fatal to man to various animals; it differs however, from these by its evolution in the insect, and its mechanism of transmission, which are common to the non-pathogenic try-

Some morphological and biological characters of three genera of mammalian Trypanosomidae.

Character	Genus *Leishmania*	Genus *Schizotrypanum*	Genus *Trypanosoma*	
			Group A	Group B
IN THE VERTEBRATE HOST				
1) More advanced form-	leishmania	trypanosome	trypanosome	trypanosome
Total length	3-4 μ diameter	short: 20 μ	large: 25-70 μ	short: 15-30 μ
Blepharoplast	(rod-shaped)	subterminal (very large)	subterminal or subcentral	subterminal or terminal
Posterior end		short	long	short
2) Multiplication-				
Proliferative form	leishmania	leishmania	crithidia, trypanosome	trypanosome
Division	binary	binary	multiple and binary	binary
Location	tissues	tissues	blood	blood
3) Cyclical evolution	leishmania	leish. - crit. - trypanosome	crithidia-trypanosome	trypanosome
Location	intracellular	intra - and extracellular	extracellular	extracellular
4) Host-specificity	$\pm$ strict	not strict	strict	not strict
5) Pathogenicity	pathogenic	pathogenic	not pathogenic	pathogenic
IN THE INVERTEBRATE HOST				
Cylic evolution	anterior station	posterior station	posterior station	anterior station
Infective form	leptomonas	trypanosome	trypanosome	trypanosome
Transmission	inoculative	contaminative	contaminative	inoculative
Principal vectors	sandflies	triatoma bugs	fleas, tabanidae keds	tsetse flies tabanidae,
Host-specificity	strict	not strict	strict	stritct
IN THE CULTURE				
Evolutive forms	leptomonas	leishmania, crithidia, trypanosome	(leish.) crithidia-trypanosome	(crithidia)-trypanosome

panosomes. *S. cruzi* cannot be rigorously included in either of these groups, as it is easily distinguished both by its morphology, and by its biology.

The combination of its biological and morphological characters perfectly justifies the maintaining of Chagas' genus and assigns to it an intermediate position between *Leishmania* and *Trypanosoma*. This appears to be the best case, if not the only justifiable one, for the demembration of the genus *Trypanosoma*.

The recognition of *Schizotrypanum* in an independent status is based upon a rigid systematic basis and imposes itself as a comprehensive and quite useful means of coordinating the members of the intricate family *Trypanosomidae*.

ACKNOWLEDGEMENT

We are very much indebted to Doctor Georges Clarebout, from the Laboratory of Léopoldville (Belgium Congo), for his valuable advises and suggestions concerning the present subject and the translation of this paper into English while visiting Rio de Janeiro.

(For references see page 207)

Neoplasma maligno primario multiplo do réto *

pelos

Drs. C. Magarinos Torres, José M. Sampaio,
Rita Alves de Almeida e Hilde Adler

(Com 1 estampa)

No Serviço de Necropsias do Hospital São Francisco de Assis, Rio de Janeiro, a cargo do Instituto Oswaldo Cruz, observamos extenso neoplasma do réto, com metastases nos ganglios linfáticos lumbares, do hilo do figado e no figado.

O estudo microscópico revelou tratar-se de dois tipos histológicos, completamente diversos, de neoplasma maligno, associados no mesmo orgão.

Tumores multiplos, em um mesmo individuo, não são de rara ocorrencia, porém decididamente raros, os casos publicados de tumores malignos, de estrutura diversa, verificados em um mesmo orgão (Warren & Gates, 1932). Na experiencia desses autores, é mais frequente escapar o cancer multiplo á observação, máxime quando não praticado o exame microscópico dos tecidos, do que ser ele erroneamente diagnosticado.

Levando em conta todos os casos referidos na literatura, em numero de 1259, a malignidade multipla ocorre em 1,84% deles. Considerando, tão sómente, os dados estatisticos da America do Norte, tal cifra é modificada para 3,7-3,9 (Warren & Gates).

Em outra estatistica (Billelo & Montanini, 1931), compreendendo 8024 necropsias feitas no Instituto Patológico da Universidade de Milão, durante os anos de 1925 a 1929, são mencionados 1154 casos de tumores malignos. Apenas em sete deles, existiam dois tumores malignos, de origem e estrutura diferentes, em um mesmo individuo. Nenhuma observação foi referida de tumores malignos diferentes, em um mesmo orgão. Os casos de tumores multiplos eram: — 1 — carcinoma do figado e carcinoma do estomago (multiplicidade duvidosa); 2 — carcinoma espinocelular do esôfago e adenocarcinoma do estomago; 3 — carcinoma sólido do esofago e adenocarcinoma do réto; 4 — adenocarcinoma do estomago e glioma do lóbo temporal; 5 — sarcoma endotelial da dura-mater

* Recebido para publicação a 15 de Dezembro de 1938 e dado á publicidade em Julho de 1939.

e carcinoma da prostata; 6 — adenocarcinoma do seio e carcinoma sólido do estomago; 7 — carcinoma cirrôso do figado e epitelioma espino-celular do assoalho da bôca.

Oberndorfer (1929) refere os seguintes casos de multiplicidade primaria do cancer: 1 : homem de 73 anos, a) carcinoma extenso do réto, b) carcinoma extenso do piloro com infiltração consideravel dos tecidos adjacentes. Metastases, provavelmente do carcinoma gástrico, nos ganglios linfaticos peri-gástricos e no figado. Histologicamente, ambos apresentam a mesma estrutura de adenocarcinoma. Os sintomas clinicos eram referentes, apenas, ao cancer do grosso intestino. 2 — mulher de 78 anos, a) *scirrhus mammae sinistrae* com « cancer en cuirasse » dos tecidos adjacentes. Histologicamente, carcinoma cirrôso indiferenciado; b) carcinoma poliposo do réto com rutura extensa na vagina. Nenhuma metastase. Histologicamente, adenocarcinoma. 3 — mulher de 81 anos, a) úlcera estenosante do réto, com fortes aderencias ao sacro e tecido conjuntivo da bacia; b) pequeno carcinoma ulcerado do piloro. Histologicamente, ambos eram adenocarcinoma. Nenhuma metastase. 4 — homem de 77 anos, a) tumor plano da *flexura coli sinistra* com ulceração central (adenocarcinoma); b) carcinoma da prostata (*pars posterior*) com hipertrofia da porção anterior da prostata. Propagação do carcinoma aos tecidos periprostaticos. Histologicamente, carcinoma cirrôso. Nenhuma metastase. 5 — mulher de 70 anos. Morte por abcesso peritiflitico, a) carcinoma do piloro (*carcinoma simplex*); b) cancer ulcerado da alça sigmoide e do réto. Histologicamente, adenocarcinoma. 6 — homem de 68 anos. Morte por tuberculose pulmonar ulcerosa, a) adenocarcinoma envolvendo, em circulo, a passagem da flexura sigmoide para o colon descendente; b) cancroide no lóbo superior do pulmão esquerdo implantado em antiga caverna tuberculosa.

Tais casos, como outros encontrados na literatura, mostram que, na maioria das vezes, não é possivel preencher, integralmente, as condições estabelecidas por Billroth para o reconhecimento da multiplicidade primaria do cancer. Devem elas ser tomadas, apenas, como condições ideais.

Admite-se que os neoplasmas multiplos, ou provêm de um unico agrupamento celular (tumores unicentricos), ou, ao contrário, formam-se, simultaneamente, ou sucessivamente, em um mesmo orgão, ou em orgãos diferentes, á custa de varios grupos celulares (tumores multicentricos).

Antes de se considerar determinado caso como exemplo de cancer multiplo, é, naturalmente, indispensavel excluir uma origem metastática ou secundária dos diversos neoplasmas, fato este que constitue, como é

sabido, a regra. Ainda, em casos menos frequentes, deve-se levar, em devida conta, a possibilidade de metaplasia do tumor primário.

A dificuldade de preencher esses *desiderata* faz com que certas localisações do neoplasma sejam, sistematicamente, consideradas, por alguns autores, como trazendo duvida a respeito de sua origem independente. Estão nesse caso, os neoplasmas multiplos do seio, os do estomago e ovario associados no mesmo paciente, os carcino-sarcomas da glandula tireoide, e outros. Ao contrario, em certos tecidos, tais como a pele, grosso intestino, faringe, estomago e útero, a variação na séde e no tipo histologico constitue evidencia satisfatoria do caráter independente das lesões (Warren & Gates).

OBSERVAÇÃO: — A. A., portuguez, com 48 anos de edade, falecido ás 15 horas de 5 de Outubro de 1937, necropsiado ás 11 horas de 6 de Outubro.

Necrópsia (n.º 3563): — O cadáver é o de um homem de côr branca, em muito más condições de nutrição, medindo 1m.55 de comprimento, pesando 51 kilos. Abdomen fortemente distendido. Externamente não ha edema, nem ictericia.

Ao córte, as camadas gordurosa e muscular reduzidas. Alças intestinais fortemente distendidas por gazes, apresentando uma superficie opaca, recoberta por material fibrinoso pouco abundante. Nas partes declives do abdomen, cerca de 200 c.c. de liquido turvo.

TÓRAX: — Espaço precordial descoberto em extensão normal.

O *coração* pesa 210 grs., medindo 11,5 x 9,5 x 4 cms., sendo perfeitamente movel no interior do saco fibroso do pericardio. Ao córte, as cavidades são diminuidas de capacidade, medindo as paredes do ventriculo direito 5 mms. de espessura, e as do esquerdo, 1,5 cms. na base. Musculatura flácida, de côr castanha-escura. Aparelho valvular integro. Cada uma das cavidades pleurais encerra cêrca de 100 c.c. de liquido limpido, amarelo. *Pulmão esquerdo* pesando 600 grs., livre de aderencias. O *direito*, pesando 500 grs., apresenta extensas aderencias fibrosas ás paredes do tórax e ao diafragma. Ambos os pulmões de volume normal, com a crepitação um pouco diminuida. Superficie do córte humida, vermelha, dando saída, pela expressão, a liquido espumoso. Não ha áreas de consolidação do tecido pulmonar, nem tecido estranho ao órgão. *Baço* pesa 114 grs., medindo sôbre a convexidade, 12,5 x 7 x 4,5 cms. Cápsula espessada, de modo difuso. Consistencia diminuida. Superficie do córte de côr violácea, o tecido conjuntivo mais aparente que em condições normais Pôlpa não difluente. *Figado* pesa 1650 grs., medindo 25 x 7 x 7,5 cms. Na face antero-superior do lóbo direito, aparecem dois nódulos, de côr esbranquiçada, constituidos por tecido estranho ao órgão, os quais mostram depressão em sua parte central. Na superficie dos córtes praticados, aparecem diversos outros nódulos formados por tecido neoplasico, medindo, os maiores, 2,5 cms. de diametro. *Ganglios linfaticos* lumbares e do hilo do figado, consideravelmente aumentados de volume, mostrando, ao córte, tecido neoplasico friavel, completa-

mente desaparecida a arquitetura de ganglio. *Intestinos,* especialmente o grosso, fortemente dilatados. Mucosa perfeitamente lisa e brilhante, ao nivel do jejuno-ileon, cecum, colon ascendente e transverso. As paredes do réto são grandemente espessadas e infiltradas por tecido neoplasico, de côr amarelo-esbranquiçada. O tecido neoplasico, sob a fórma de pequenos nódulos, invade a porção terminal do colon descendente. Cavidade do réto ligeiramente diminuida. Não ha polipos. *Prostata, bexiga, estomago* e *pancreas* não apresentam neoplasma. *Craneo:* não foi examinado.

EXAME MICROSCOPICO:

Réto:

Preparação n.º 1: — Em cêrca de metade do preparado, as tunicas do intestino mostram arquitetura normal, notando-se extensa descamação dos epitélios de revestimento e glandular. Na porção restante, as paredes são invadidas por tecido neoplasico, a mucosa sendo conservada, apenas, em pequenas áreas intercaladas com outras onde a superficie interna do intestino é formada pelo próprio tecido neoplasico. Em determinado ponto, as células neoplasicas constituem nove nódulos distintos. O maior, situado superficialmente, substitue a mucosa, formando, êle mesmo, a parede interna do réto. Os demais, de dimensões tanto menores quanto mais distantes da luz do intestino, ocupam a sub-mucosa e penetram, superficialmente, na muscular. Moderada proliferação de tecido conjuntivo adulto aparece em torno do tumor. Em outro ponto, cinco nódulos distintos, justapostos, superpõem-se; a tunica muscular é invadida pelo tumor, o seu plano circular, em parte, destruido e substituido por tecido neoplasico. A peritoneal, espessada, mostra células do tumor dispostas em pequenos cordões, em torno dos quais existe discreta proliferação de tecido conjuntivo adulto. A superficie do peritoneo é recoberta por fibrina; em sua espessura existem células endoteliais, linfocitos, e pequeno numero de células neoplasicas. Não ha polimorfonucleares. As células do tumor, de fórma cilindrica, apresentam tamanho médio e variação nas dimensões do núcleo (Fig. 2). Os núcleos maiores são relativamente pobres de cromatina. O aspecto mais frequente é o alveolar. Em determinados pontos, comtudo, as células dispõem-se em torno de uma cavidade central, contendo elementos destacados, necrosados (Fig. 2).

Preparação n.º 2: — O neoplasma, com a estrutura de adenocarcinoma, ocupa a sub-mucosa e a muscular. A mucosa, com descamação total dos epitélios de revestimento e glandular, recobre o tumor.

Preparação n.º 3: — O neoplasma mostra a estrutura de adenocarcinoma. Constitue dois nódulos maiores e seis menores, localisados na sub-mucosa. A muscular é integra. Na tunica peritoneal aparecem oito nódulos confluentes, o maior dos quais com pequena área de necrose central.

Preparação n.º 4: — O adenocarcinoma alveolar infiltra, em larga extensão, as tunicas sub-mucosa e muscular. Grande parte da muscular é substituida por tecido neoplasico. Na peritoneal, as cavidades marginadas por células neoplasicas são grandemente distendidas e transformadas em cistos de conteúdo mucoso. Alguns cistos, com calcificação parcial.

Preparação n.º 5: — O fragmento é revestido pela mucosa com descamação total dos epitélios de revestimento e glandular. O adenocarcinoma alveolar constitue grandes nódulos contiguos (Fig. 1, *b*), em alguns dos quais a estrutura alveolar não é mais distinguida. Neste preparado, o adenocarcinoma ocupa a sub-mucosa e grande parte da muscular. No mesmo preparado, nota-se outro tipo histologico de tumor (Fig. 1, *a*), identificavel a um carcinoma epidermoide. As células neoplasicas formam cordões estreitos ramificados, infiltrando a parte mais externa da tunica muscular e a peritoneal. Os cordões orientam-se perpendicularmente á superficie do intestino. Elementos semelhando células espiculadas aparecem, isolados, e de modo conspicuo, em diversos pontos dos cordões (Fig. 3).

Preparação n.º 6. — Nota-se a presença de dois tipos diversos de neoplasma epitelial. O adenocarcinoma alveolar ocupa a sub-mucosa e a tunica muscular imediatamente subjacente, constituindo massas esféricas. O carcinoma epidermoide ocupa a tunica serosa, onde forma nódulos com acentuadas propriedades desmoplasticas. Constitue, ainda, estreitos cordões e pequenos nódulos os quais infiltram a porção externa da tunica muscular, sem alcançar a mucosa.

RESUMINDO:

O exame microscópico de seis preparações retiradas de pontos diversos do neoplasma do réto, mostrou, em todos êles, a presença de um adenocarcinoma alveolar, outras vezes com células mais indiferenciadas. O tumor ocupa a mucosa e a sub-mucosa, invadindo, por vezes, a tunica muscular e a peritoneal.

Em duas preparações, além do adenocarcinoma, aparece um carcinoma epidermoide. Este ocupa a parte externa da tunica muscular, e a peritoneal, não alcançando a mucosa.

Figado: — O tumor apresenta a estrutura de adenocarcinoma.

Ganglios linfaticos lumbares e do *hilo do figado*: — O tumor apresenta a estrutura de adenocarcinoma.

O estudo microscópico revelou, ainda, o quadro tipico da *peritonitis carcinomatosa*. O carcinoma epidermoide não apresenta metastases.

DIAGNOSTICO ANATOMICO: — Adenocarcinoma do réto com metastases nos ganglios linfaticos lumbares, do hilo do figado e no figado. Carcinoma epidermoide do réto (sem metastases). Estenose do réto. Obstrução intestinal. Peritonitis carcinomatosa. Atrofia parda do miocardio. Edema e congestão dos pulmões. Hidrotórax duplo (leve). Hidroperitoneo (leve). Atrofia e fibrose do baço. Pleurite fibrosa crônica adesiva direita (extensa).

RESUMO

A necropsia de um homem branco, portuguez, de 48 anos de edade, revelou a existencia de dois neoplasmas malignos com estrutura histológica diferente, localisados em um mesmo órgão, o réto.

Um dêles, provavelmente o mais antigo, é um adenocarcinoma com metastases no peritoneo, no figado e nos ganglios linfaticos lumbares e do hilo do figado. O outro, é um carcinoma epidermoide, sem metastases

Não havia polipose intestinal.

A observação é apresentada como neoplasma maligno primário multiplo.

Macroscopicamente nada indicava a multiplicidade do tumor, e o caso teria, certamente, escapado á observação, se não houvesse sido praticado o exame histológico.

A observação ilustra a multiplicidade do cancer em individuo relativamente moço, apoiando a idéia de que ela não se acha ligada a um tempo maior de duração do individuo, condição que, necessariamente, aumentará as suas probabilidades de adquirir o cancer.

ZUSAMMENFASSUNG.

Bei der Obduktion eines 48 jährigen Mannes (Weisser, Portugiese) fanden sich zwei maligne Neoplasmen von verschiedener histologischer Struktur in ein und demselben Organ, dem Rektum.

Eines der beiden Neoplasmen, vermutlich das ältere, ist ein Adenokarzinom mit Metastasen in das Peritoneum, in die Lymphoglandulae hepaticae und aorticae und in die Leber. Das andere ist ein epidermoides Karzinom ohne Metastasen. Eine Polypose des Intestinum bestand nicht.

Der Befund wird als ein Fall von primärer Multiplizität von zwei Karzinomen in demselben Organ, dem Rektum, dargestellt.

Makroskopisch wies nichts auf die Multiplizität des Tumors hin, und der Fall wäre gewiss der Beobachtung entgangen, wenn die histologische Untersuchung unterblieben wäre.

Die Beobachtung bildet eine Illustration für das Vorkommen von primärer Multiplizität des Krebses in einem relativ jungen Individuum. Sie unterstützt die Anschauung, dass es zu der Entwicklung eines derartigen Befundes in einem Individuum keiner langen Dauer bedarf, die indessen die Chance einer krebsigen Erkrankung vergrössern würde.

TRABALHOS CITADOS

BILLELO, A. & MONTANINI, N.

1931. Pluricita di tumori maligni nello stesso soggetto. Tumori, **5** : 369. Res. *in* Amer. J. Cancer, **16** : abst., p. 310, 1932.

BILLROTH, cit. por OBERNDORFER, S.

1929. Die Geschwülste des Darmes, *in* Henke, F. & Lubarsch, O. Hand. d. spez. path. Anat. u. Histologie, Bd. IV/3.

WARREN, S. & GATES, O.

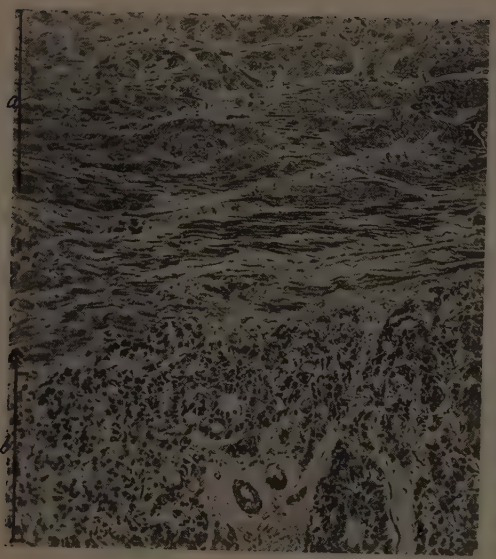
1932. Multiple primary malignant tumors. A survey of the litterature and a statistical study. The Amer. J. Cancer, **16** : 1358-1414.

Estampa 1

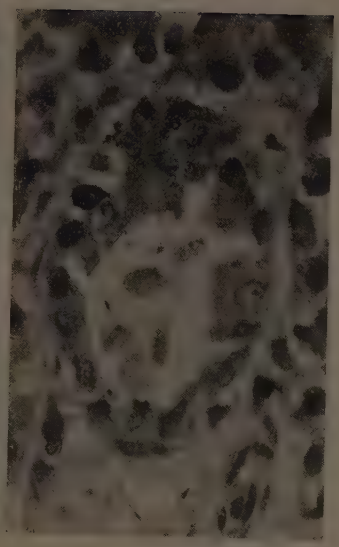
Fig. 1 — Paredes do réto (necrópsia n.º 3563). Neoplasma maligno primario multiplo. Na porção superior (*a*), correspondendo á porção externa (tunicas muscular e peritoneal), nota-se um carcinoma epidermoide. As cêlulas, providas de núcleos relativamente volumosos, formam cordões dispostos em um mesmo sentido e anastomosados entre si. O neoplasma mostra acentuadas propriedades desmoplasticas. Na porção inferior (*b*), correspondendo ás tunicas mucosa e sub-mucosa, nota-se um adenocarcinoma, com células de dimensões médias e pequenas. A estrutura alveolar aparece em certos pontos, ao passo que em outros, o tumor forma cordões estreitos sem luz definida. X 105.

Fig. 2 — Paredes do réto (necrópsia n.º 3563). Adenocarcinoma alveolar. X 630.

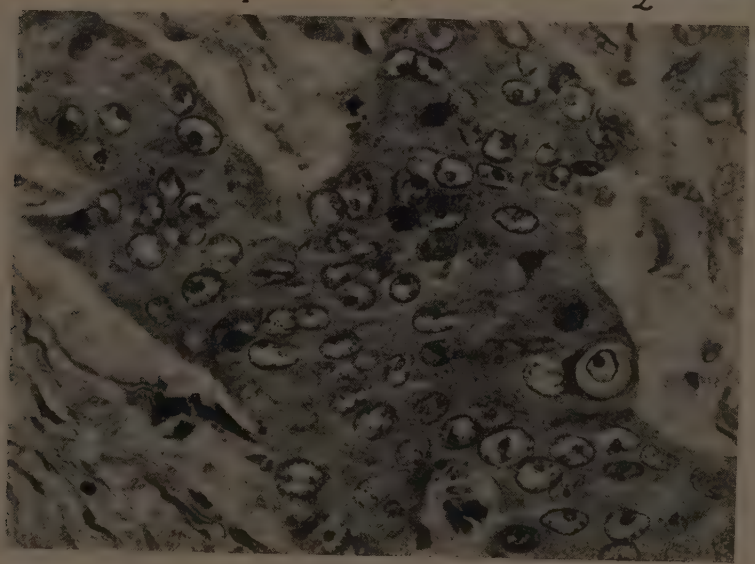
Fig. 3 — Paredes do réto (necrópsia n.º 3563). Carcinoma epidermoide. As células neoplasicas constituem cordões compactos. Aqui e ali aparecem, de modo conspicuo, grandes cêlulas com citoplasma claro e contornos nitidos, semelhando células espiculadas. X 630.



1



2



3

Torres, Sampaio, Almeida e Adler: Neoplasma multiplo.

Estudos sobre a determinação da vitamina B_1 (aneurina, tiamina) na herva mate *

por

Gilberto G. Villela

(Com 6 graficos no texto e 3 estampas)

A infusão de mate (chá do Paraguay, herva mate, yerba mate) obtem-se pela extração aquosa a quente das folhas da planta « Ilex paraguarensis » St. Hil. As propriedades fisiologicas desta bebida têm sido pouco investigadas. Os estudos iniciais se fizeram de modo bastante empirico, tendo-se atribuido ao mate efeitos vagos e indeterminados sobre o metabolismo e a digestão gastrica. Lesage verificou que a infusão de mate atúa sobre a atividade muscular e modifica a acidez gastrica. Esses resultados devem ser atribuidos em parte á presença de cafeina na infusão do mate.

O estudo das enzimas oxidantes e a ação sobre o metabolismo glicidico do extrato de mate, foi feito por Otero (23) (24) (25). A questão da presença de vitamina C na herva mate ainda é discutida. Escudéro e colaboradores (5) encontraram, pela titulação com o corante di-clorofenol indofenol, quantidades apreciaveis de ácido ascórbico nas folhas e na infusão do mate, ao passo que Mendive não conseguiu siquer isolar a vitamina sob a forma de vitamosazona, acreditando que se esta vitamina existe deve ser em quantidade muito pequena (20). Em experiencias a serem publicadas proximamente, não nos foi possivel obter respostas positivas em cobaios tornados escorbuticos, nem tampouco impedir o aparecimento da avitaminose nesses animais, quer com o extrato quer com a propria folha. Gatti Menéndez e Knallinsky (20) tambem não conseguiram modificar a evolução do escorbuto humano, que grassou no exercito paraguaio, com a ingestão de doses elevadas da infusão do mate. No cobaio tambem não obtiveram qualquer ação protetora contra a avitaminose C. Deulofeu, do Instituto Bacteriologico de Buenos Aires, nos comunicou recentemente, que tambem não conseguira resultados positivos com a herva mate no que respeita o teôr em ácido ascórbico.

---

* Recebido para publicação a 14 de Novembro de 1938 e dado á publicidade em Julho de 1939.

O valor alimentar da herva mate suscitou até agora numero pequeno de trabalhos. Otero, na Argentina, procurou verificar se o infuso de mate continha vitaminas. Para a vitamina A empregou a tecnica do crescimento do rato e para as vitaminas do grupo B, instituiu pesquizas em ratos e pombos como tambem ensaiou a tecnica do desenvolvimento do levedo de Williams e do consumo de glicose de Damianovich e Catan (22). Concluiu Otero que o mate contém vitaminas B_1 e B_2 e A, entretanto não foi feita nenhuma determinação quantitativa. Os tests feitos com o pombo forneceram resultados pouco demonstrativos; nem a dieta nem a sintomatologia foram tampouco referidas. O criterio citado da hiperglicemia tambem não serve como indice da avitaminose. A ação sobre o crescimento do levedo é igualmente destituida de valor porquanto é inespecifica. Todavia, os resultados obtidos nos animais fazem entrever a presença de vitamina B na herva mate.

Em 1934, M. Saraiva (30) publicou uma pequena nota sobre o mate, em revista não tecnica, em que incidentemente cita algumas experiencias por ele executadas no Instituto de Quimica sobre a presença de vitamina B_1 na infusão do mate. Refere este autor que 40 cc. da infusão a 12,5 grs. %, em substituição á agua potavel, por dia, evita a avitaminose dos pombos alimentados exclusivamente com arroz descorticado. Concluiu que a herva mate contém vitamina antineuritica suficiente para prevenir a polinevrite quando ministrada liberalmente. Devemos lembrar que não foi feita nenhuma dosagem quantitativa.

Dado o numero pequeno de observações e a falta de determinações quantitativas nos propuzemos a verificar se de fato a herva mate encerra vitamina B_1 e em que quantidade. Os trabalhos anteriores não esclarecem se a vitamina encontrada é realmente a antineuritica ou o conjunto dos fatores do grupo B.

TÉCNICAS EMPREGADAS

Os ensaios em animais sendo sujeitos a varias causas de erro quando a percentagem de vitamina é muito pequena, procuramos comprova-los por meio de outros processos hoje bastante empregados e que permitem dosar a vitamina com material menos abundante e com maior rapidez. O presente trabalho só se refere á vitamina B_1 que recebeu as denominações de aneurina por Jansen e de tiamina por Williams.

Os tests empregados foram os seguintes:

a) tests do pombo e do camondongo (Peters, Cowgill);
b) test vegetal (Schopfer e Jung);
c) test da fluorescencia do tiocromo (Jansen).

Os tests animais no pombo e no camondongo forneceram resultados pouco satisfatorios, mas permitiram evidenciar a presença qualitativa da aneurina.

Ensaio com o pombo.

Adotou-se primeiro o criterio curativo (Peters), depois o preventivo e por fim o da manutenção do peso (Carter (2), Cowgill (4)). Os animais para as primeiras experiencias foram pesados e mantidos inicialmente com a alimentação de arroz descorticado, polido e lavado. A lavagem e secagem são indispensaveis para retirar qualquer quantidade de aneurina presente no pó que fica aderente ao grão (Spruyt) (40). A alimentação com arroz deve ser durante 8 a 10 dias sómente, porque o arroz descorticado não é um alimento satisfatorio para o equilibrio alimentar do pombo, não só no que diz respeito ás vitaminas A e D como tambem ás proteinas e sais minerais. Por esse motivo adotamos uma dieta mixta composta de arroz descorticado e lavado, caseina purificada, gordura de manteiga, mistura salina (Mc Collum 185). O todo é adicionado de agua, sêco na estufa e cortado em pequenos pedaços. O óleo de figado de bacalhão foi ministrado por via oral em gotas emulsionadas com agua e introduzido com sonda. A vitamina C não foi adicionada porque o pombo é capaz de sintetiza-la (Simmonet, Sugiura e Benedict) (39). Em alguns casos empregamos o hidrolizado alcalino de carne (tendões, aponevroses). Este era misturado com maizena, sêco a 120º e triturado. Os animais se adaptam facilmente a essa dieta.

Cowgill (4) empregou, com bons resultados, os residuos da carne de vaca como fonte suplementar de proteinas.

O peso inicial dos pombos variou de 320 a 400 grs., os quais ficavam de 8 a 10 dias com a alimentação exclusiva de arroz descorticado passando em seguida á dieta com caseina acima descrita. Ao cabo de 12 a 15 dias apareciam os primeiros sintomas. Os fenomenos nervosos eram mais tardios, sobretudo quando a alimentação é forçada. O opistotono nem sempre aparece. Alguns morrem sem que se verifiquem sintomas agudos. A questão do aparecimento do opistotono parece depender da localização da lesão quimica do sistema nervoso, como muito bem fizeram vêr recentemente Galvão e Pereira (7).

A prova da cura foi instituida em 4 pombos que apresentaram sintomas tipicos. A injeção de 20 cc. do extrato aquoso a 10% não alterou a atitude nem o opistotono, mesmo a introdução por meio de sonda (40 cc. do infuso a 5 e 10%) não determinou nenhuma cura. Em um caso foi possivel pela ministração de 10 grs. do adsorbato total correspondente a 20 grs. da herva mate obter melhora sensivel com volta do apetite e desaparecimento do opistotono.

O desaparecimento do opistotono não indica a rigor que a substancia contém vitamina B_1, desde que outras substancias podem igualmente gozar desta propriedade, assim a histamina (Peters). A cura expontanea tambem pode ser observada (Kon e Drummond) (14). Em bôas condições experimentais o test curativo pode ser util (Kinnersley, Peters e Reader) (2).

Fizeram-se outras experiencias com o fim de verificar o impedimento dos fenomenos polinevriticos (test preventivo) tanto com o emprego da infusão como do adsorbato. Sómente o adsorbato foi capaz de evitar o aparecimento

da avitaminose, com relativa manutenção do peso, em 3 pombos dos 6 estudados.

A manutenção do peso foi possivel quando pela adição da herva pura á maizena sêca na estufa e triturada em seguida. A quantidade diaria de herva foi de 30 grs. O peso se manteve durante 6 a 7 dias. Houve depois quéda de peso.

Os pombos mais pesados são os que se prestaram mais ao ensaio.

A terra de infusorio conhecida como reagente de Lloyd tem grande poder de adsorção pela aneurina, como já foi demonstrado varias vezes (Salmon, Guerrant e Hay, Levene e van der Hoeven) (28) (29) (16). Utilizamos tambem com bons resultados o kaolim lavado e sêco.

A ministração da infusão do mate só pode ser feita por meio de sonda fina introduzida no papo. O volume de liquido não deve ultrapassar 15 cc., senão o animal regorgita todo o conteúdo estomacal. A substituição da agua potavel pela infusão não é recomendavel, porque o animal utiliza muito pouco liquido e cada vez menos.

As respostas pelo peso não foram muito satisfatorias. O grafico 1 (p. 241) apresenta os ensaios com a infusão aquosa a 5 e 10% e com o adsorbato total equivalente a 25 grs. da folha original.

O ensaio com o camondongo tambem não foi muito demonstrativo, excepto quando se utilizou o adsorbato. Foram escolhidos camondongos machos de 28 a 30 dias de idade e pesando 7 a 9 grs. Os animais em numero de 16 foram separados por grupos de 2 em gaiolas metalicas com fundo gradeado para evitar o acumulo de fezes e a coprofagia.

A dieta empregada foi a de Evans e Lepkovsky:

Caseina	20 partes
Sacarose	70 »
Mistura salina	4 »
Levedo autoclavado	10 »

A caseina usada foi a de Schuchardt (Görlitz) purificada 3 vezes. A caseina é primeiro agitada com solução acetica a 0,1% durante 2 dias e depois extraída com alcool. Adicionam-se 2 litros de alcool para 400 grs. Decanta-se, adiciona-se alcool absoluto, filtra-se no buchner e seca-se na estufa a 60°. A sacarose deve ser pura. A mistura salina é de Mc Collum-Davis N.° 185 e tem a seguinte composição.

Lactato de calcio	35,15 grs
Fosfato de calcio	14,60 »
Fosfato acido de potassio	25,78 »
Fosfato de sodio	9,38 »
Clorêto de sodio	4,67 »
Sulfato de magnesio	7,19 »
Citrato de ferro	3,19 »

O levedo é preparado como segue:

Seca-se 1 kilo a 60° que fornece perto de 360 grs. Usamos o fermento Fleishmann fresco em tijolos. Para cada 100 grs. do levedo seco, adicionam-se

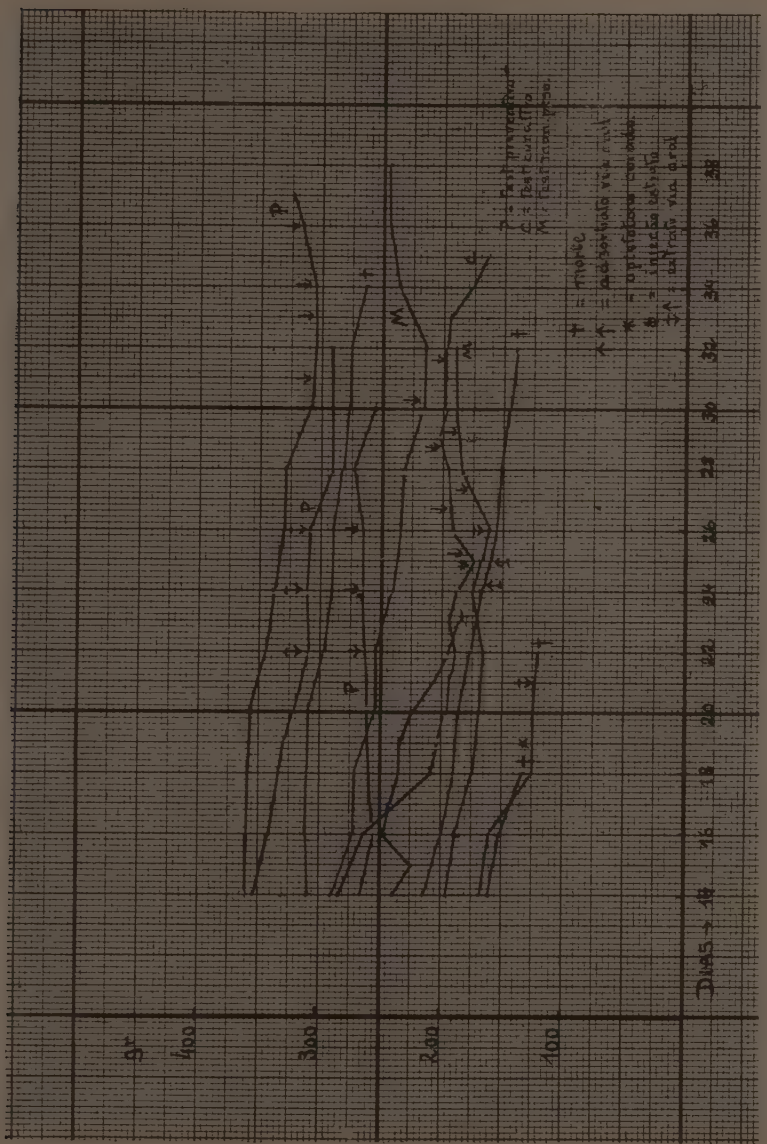


Gráfico 1 — Test do pombo.

125 cc. de soda N/10 formando então uma pasta leitosa. Leva-se á autoclave durante 6 horas a 120º. Neutraliza-se com acido cloridrico 0,1 N. Seca-se na estufa e tritura-se. O pó é adicionado á dieta. Com esta dieta praticamente isenta de vitamina B_1 e contendo vitamina B_2 e os demais fatores, os animais crescem durante 1 semana até haver parada do peso. Principia-se então a dar a substancia a ensaiar. As testemunhas morreram 20 a 22 dias depois.

A ministração do adsorbato (1 gr. por dia) foi capaz de manter o peso durante 8 dias. A injeção de 1 cc. do liquido concentrado (eluição de 3 grs. de adsorbato) repartido em 3 porções determinou ligeiro aumento do peso. Perturbações da marcha e a polinevrite só foram obtidas em 4 animais. Para esses sintomas serem mais constantes é necessario que a dieta contenha aneurina em pequena quantidade ou que se injetem pequenas dóses (0,5 unidade de dois em dois dias). O grafico abaixo mostra a resposta ao adsorbato.

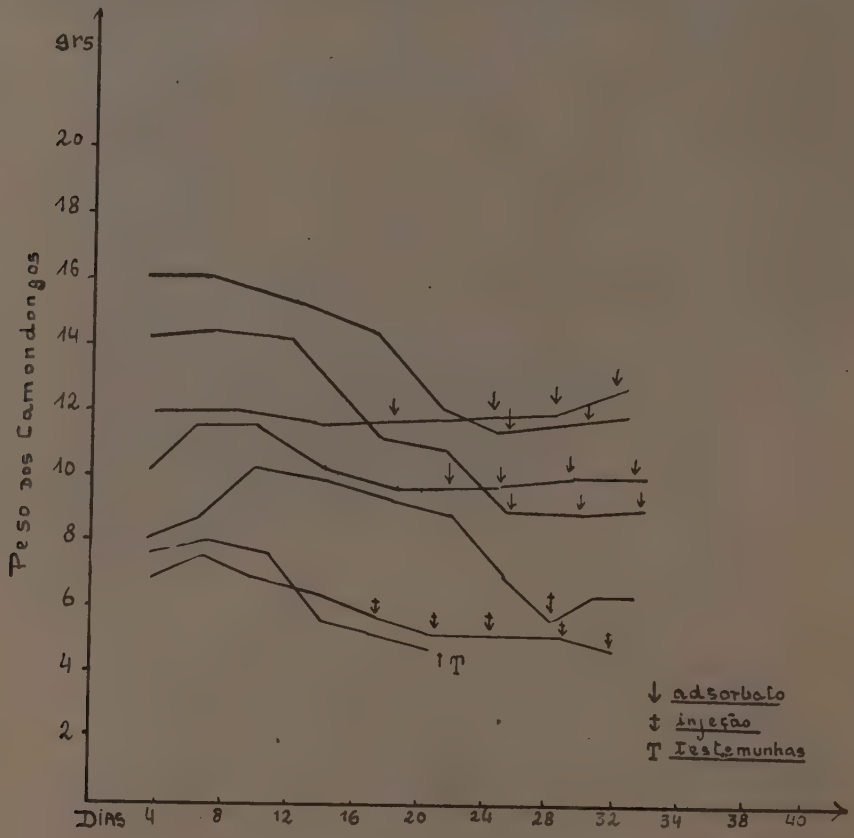


Grafico 2 — Resposta á ingestão do adsorbato e á injeção do liquido de eluição em camondongos carenciados (avitaminose B).

Os ensaios feitos com os demais tests (Schopfer-Jung, Jansen) permitiram verificar que o adsorbato, correspondendo a 1 e 2 unidades internacionais de aneurina, fornece pelos tests do pombo e do camondongo respostas pouco uniformes e incertas. Os animais nem sempre reagem bem quando a quantidade de vitamina é muito pequena.

TEST VEGETAL DE SCHOPFER E JUNG.

Desde os trabalhos iniciais de R. J. Williams, de Funk e Dubin, de Eddy, de Bachman e de tantos outros, se procurou mostrar que os levedos necessitam de vitamina B para o seu desenvolvimento. Esse fato mereceu a atenção especial de Williams que propoz um test para a dosagem da vitamina B_1 baseado no crescimento do levedo. Funk e Dubin, Eddy e Stevenson, Fraenkel e Schwartz tambem indicaram varias tecnicas fundamentadas na proliferação das células do levedo, avaliadas por gravimetria, por contagem de células ou pela produção de CO_2. As inumeras pesquizas sobre a natureza dos fatores de crescimento dos microorganismos vieram mostrar que o « bios » que atúa com enorme intensidade no desenvolvimento do levedo não deve ser confundido com a vitamina B^1. O « bios » é por si constituido de 2 ou mais fatores. A aneurina é um fator importante para o levedo, mas que pode em muitos casos ser sintetizada por êle. Portanto, os tests baseados no crescimento do levedo para a dosagem da aneurina deixam de ter valor dada a sua inconstancia e inespecificidade (41).

Em 1930, Schopfer verificou que um cogumelo da familia das Mucorineas, o « Phycomyces blakesleeanus, Bgf » tem a faculdade de só se desenvolver quando o meio encerra a aneurina. Quando este cogumelo é semeado em meio sintético não se dá nenhum ou quasi nenhum desenvolvimento. A adição de quantidades diminutas de aneurina (0,0005 y por 1 cc. do meio) já permitem o seu crescimento. A ação da vitamina é proporcional á quantidade adicionada. Quando é atingido um certo limite, uma nova adição é sem efeito e mesmo nociva (Schopfer). De 1931 a 1935, Schopfer e Jung, propuzeram um test para a dosagem da aneurina baseado na sensibilidade do « Phycomyces » ás pequenas doses dessa vitamina (31) (34).

As soluções puras contendo vitamina B fornecem curvas facilmente interpretaveis (33). Quando se tem que experimentar substancias complexas torna-se indispensavel fazer um tratamento prévio para isolar a vitamina. O ensaio com as soluções purificadas dá valores bastante constantes para que sejam utilizados com proveito nas dosagens quantitativas.

PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DO MATE.

Os extratos aquosos simples do mate foram por nós primeiramente ensaiados e se mostraram ativos sobre o desenvolvimento do « Phycomyces » em doses bastante pequenas (0,05 cc. para 20 cc. do meio. 0,0025 cc. para 1 cc. do extrato a 5%). O grafico abaixo mostra bem a proporcionalidade da sua ação.

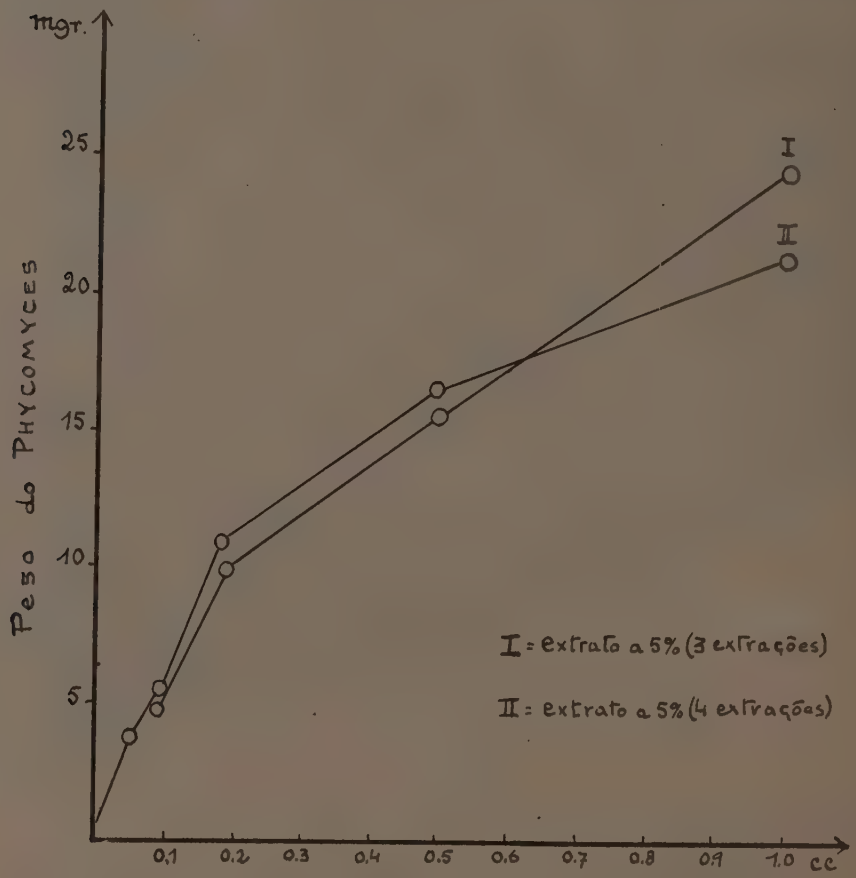


Grafico 3 — Ação do extrato aquoso a 5 o/o sobre o desenvolvimento do "Phycomyces".

Entretanto, para uma determinação mais exata torna-se necessario purificar o extrato, eliminando as substancias que possam ter influencia sobre o crescimento do cogumelo.

A regularidade da curva acima (grafico III) mostra que a substancia ativadora existente no extrato não purificado age tal como a aneurina. A presença de azoto no extrato podia ser um fator perturbador desde que se sabe que a curva varia com a concentração do azoto do meio. Para verificar esse ponto, dosamos pelo Kjeldahl a quantidade existente de azoto para 1 cc. do extrato. A quantidade achada foi de 0,056 mg., que diluida em 20 cc. do meio fica na concentração de 0,000028 mg. para 0,1 cc. do extrato e 0,0028 mg. se fôr adicionado 1 cc., portanto não influe sobre a concentração total em azoto do meio.

A existencia de cafeina no mate nos sugeriu que esta substancia poderia atuar sobre o desenvolvimento do cogumelo. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Quadro 1

Cafeina [solução 0,2 o/o]	Quantidade adicionada	Peso do "Phycomyces"
1 cc. equivalente a	2 mg. cafeina	23,3 mg.
0,5 cc. « a	1 mg.	26,4 mg.
0,1 cc. « a	0,1 mg.	30,8 mg.
0,05 cc. « a	0,05 mg.	25,3 mg.
Sem adição de cafeina	———	24,6 mg.

Balões de 150 cc. com 25 cc. do meio.

Todos os balões foram adicionados de 0,2 γ de aneurina.

As pequenas diferenças, pouco significativas, devem-se provavelmente ao teôr em azoto da cafeina. A cafeina contida em 100 cc. do extrato é de 2,5 mg., sendo que 1 cc. conterá sómente 0,5 mg. e 0,1 cc. 0,05 mg. que para o volume de 25 cc. do meio ficaria de 0,02 mg. para 1 cc. do meio. Nessa concentração como se vê no quadro acima a ação da cafeina do extrato é praticamente nula. Os valores referidos na literatura para o teôr em cafeina das folhas variam de 0,52% (Stengel) até 0,89% (König) e 1,85% (Stenhouse e Stahl) (15) (48). Experimentamos tambem a influencia da acetilcolina e da adenina, que já têm sido encontradas no mate, sem que observassemos qualquer ação estimulante sobre o desenvolvimento do « Phycomyces ».

Quadro 2

Aneurina	Acetilcolina	Peso do cogumelo
0,2 γ	10 mg.	23,1 mg.
0,2 γ	5 mg.	26,0 mg.
Aneurina	Adenina	
0,2 γ	10 mg.	25,9 mg.
0,2 γ	5 mg.	21,8 mg.
Testemunhas (0,2 γ de aneurina)		25,4 mg.
Sem aneurina e com adenina e acetilcolina		Ausencia de desenvolvimento

O extrato simples foi obtido da seguinte forma:

5 grs. de folhas são extraidas com 100 cc. de agua em ebulição contendo 1% de acido acetico (pH 3.8-4.0). A agua é adicionada por 3 porções de modo a extrair maior quantidade de material. Filtra-se e o filtrado é utilizado para os ensaios. A purificação foi feita pela adsorção da aneurina com terra de infusorio, kaolim e carvão (norita). Todos os tres adsorventes se mostraram ativos, bem que o kaolim e a terra de infusorio (Merck) tenham dado melhores resultados, com o pH de 4.0. Levene e van der Hoeven (1924) já haviam verificado que o reativo de Lloyd (terra de infusorio) adsorve seletivamente a vitamina B_1. A vitamina B_2 só é adsorvida quando o pH é muito baixo (0,05 a 0,1) e a eluição muito mais dificil (Narayanan e Drummond) (16) (21).

O preparo do adsorbato foi feito da seguinte maneira. Pesaram-se 50 grs. das folhas e adicionaram-se 500 cc. de agua contendo 1% de acido acetico glacial. Deixou-se na geladeira durante 12 horas, agitando-se frequentemente. O liquido foi filtrado e adicionado de alcool a 95° acidulado com 0,5 cc. de acido sulfurico M/1. Adicionou-se em seguida 20 grs. de kaolim ou de terra de infusorio e deixou-se na geladeira durante 3 horas. Filtrou-se no Buchner e lavou-se o adsorbato com a solução acetica a 1% e alcool a 95°. O adsorbato depois de sêco na estufa a 100° foi então empregado nas experiencias em animais.

Para os ensaios com a tecnica de Schopfer preparamos preferentemente o adsorbato da seguinte fórma: o extrato a 5% em solução aquosa contendo 1% de acido acetico é adicionado do adsorvente. Para cada 10 cc. de extrato empregamos 0,2 g. de kaolim puro lavado ou de frankonite ou terra de infusorio Merck. O maximo de adsorção é obtido quando o adsorvente fica 12 horas em contato com o extrato, na gela-

deira. Após esse tempo centrifuga-se e o adsorbato é lavado com solução acetica a 1% e alcool a 95° e sêco na estufa a 100°.

A quantidade de 0,2 grs. é suficiente para a terra de infusorio como para o kaolim, bem que este seja mais ativo. O carvão (norite) não é aconselhavel para este test porque dificulta a separação do cogumelo.

Quadro 3

Quantidade do adsorvente em mgs.	Peso do "Phycomyces" em mgrs.		
	Carvão	Terra de infusorio	Kaolim
100	15	26	40
200	22	25	39
500	—	25	—

TECNICA DE DOSAGEM.

A tecnica de Schopfer-Jung consiste na semeadura do cogumelo em meio sintetico adicionado da substancia contendo a aneurina e a pesagem da cultura depois do desenvolvimento completo no 10.° dia.

MEIO DE CULTURA SINTETICO.

O meio sintetico usado foi o de Schopfer cuja composição é a seguinte:

Glicose	50 grs.
Asparagina	1 gr.
Fosfato acido de potassio	1,5 gr.
Sulfato de magnesio	0,5 gr.
Agua	1000 cc.

Foram usados balões de vidro neutro de 150 cc. e de 20 cc. arrolhados com algodão hidrófilo. O algotão bruto deve ser evitado porque contém um fator de crescimento (pirimidina) (Schopfer (35). Em alguns casos tambem empregamos tubos de ensaio.

A substancia a ensaiar (extrato ou adsorbato) é adicionada ao meio sintetico. Os balões são levados ao autoclave onde permanecem a 110° durante 10 minutos exatos. Depois de frios são adicionados de 2 gotas da suspensão recente de esporos do « Phycomyces ». A cultura do « Phycomyces blakesleeanus, Bgf, amostra sexuada, deve ser feita em meio sólido (agar e malt a 2%). Nós empregamos amostras que nos foram gentilmente enviadas pelo Prof. W. H. Schopfer do Instituto Botanico da Universidade de Bern.

VOLUME DO MEIO.

O volume do meio empregado inicialmente por Schopfer e Jung foi de 25 cc. em balões de Erlemeyer de 150 cc. de capacidade. A cultura tambem se desenvolve bem em tubos de ensaio, sendo neste caso o volume de liquido de 1 cc. ou 2 cc. e a concentração de asparagina de 2,5 gr. por litro. A tecnica da cultura em tubos foi por nós anteriormente utilizada (42) e recentemente proposta por Schopfer e Jung para a dosagem de pequenas quantidades de aneurina (33).

COMPOSIÇÃO EM ASPARAGINA.

A concentração em asparagina é muito importante para a obtenção

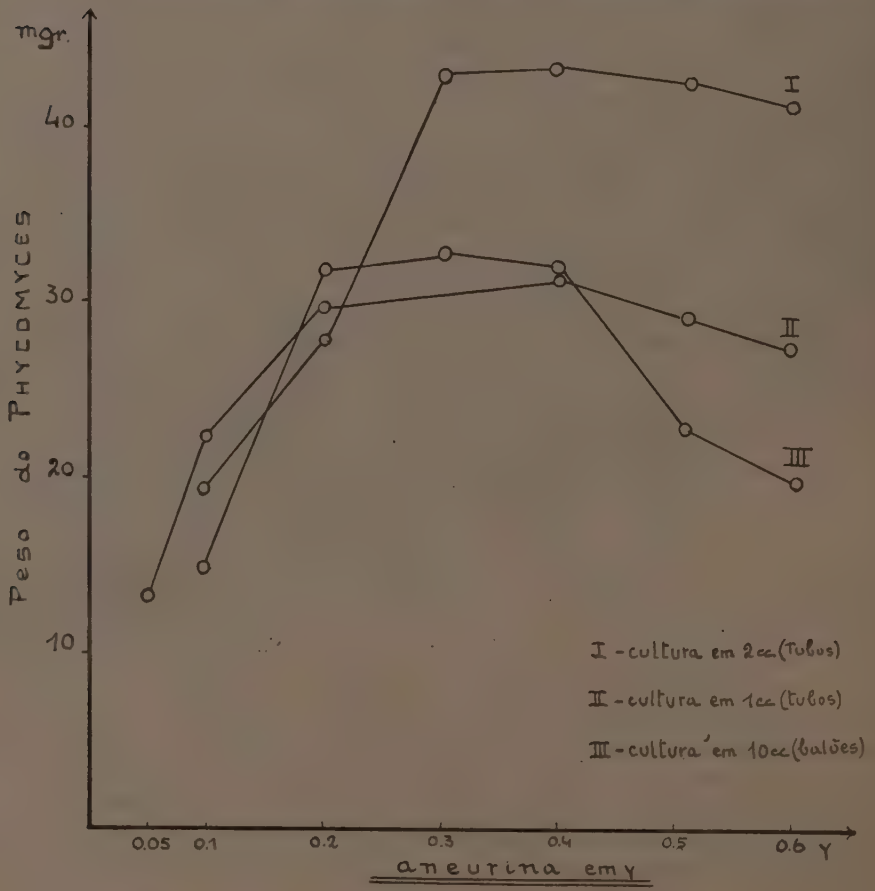


Grafico 4 — Curvas de peso do "Phycomyces" em tubos e balões contendo volumes variaveis (1,2 e 10 cc.) do meio sintetico.

de curvas de peso homogeneas. Na fórmula de Schopfer a concentração é de 1 g. por litro e o volume do meio de 25 cc. Meiklejohn obteve resultados muito constantes com a asparagina a 2 g. por 1000, usando volumes pequenos do meio nutritivo (3 cc.). Sendo o peso da colheita proporcional ao teôr em asparagina, é portanto indispensavel que se façam dosagens sempre com o meio de composição e volume identicos. O grafico acima mostra diferentes curvas de peso por nós obtidas com volumes diversos do meio.

Inoculação do cogumelo.

A emulsão de esporos é preparada no mesmo dia da semeadura, partindo de uma cultura em meio sólido bem desenvolvida (7 a 8 dias). Costumamos adicionar 10 a 15 cc. do meio nutritivo ao tubo contendo a cultura e agitar bem até que a emulsão fique turva. Aspira-se com pipeta Pasteur e deixa-se cair 2 gotas em cada balão. Agita-se no mesmo dia e nos 2 dias seguintes para que a emulsão se distribua bem nos balões. A quantidade de esporos inoculados não tem grande importancia; as culturas fornecem finalmente o mesmo peso tanto com emulsões de 300.000 como de 1 milhão de esporos por mm^3 (Schopfer). A quantidade de aneurina que a emulsão pode acarretar por si só é insuficiente para influir no desenvolvimento do cogumelo no meio sintetico. Ás vezes aparece uma pequena turvação devido a esse fato mas cuja cultura final não fornece um peso superior a 10 mg.

Separação dos micelios.

Ao cabo de 10 dias a cultura atingiu o crescimento maximo, sendo então retirados os micelios facilmente para a secagem e pesagem. Introduz-se um bastão, desprega-se a massa micelar compacta que logo lhe fica aderente. Lava-se a cultura em agua distilada e seca-se na estufa a 100° durante 1 hora. Pesa-se com balança analitica. Quando o desenvolvimento é minimo, como no caso da presença de traços de aneurina, a cultura fica submersa, sem formação de hifas aereas e esporangios.

Preparo do padrão.

Ao mesmo tempo que se preparam os balões com o material a analizar, prepara-se tambem uma série de balões de igual capacidade e com o mesmo volume do meio, e adiciona-se a vitamina padrão de kaolim ou de terra de infusorio, em que 10 mg. representam uma unidade

internacional. O adsorbato padrão é fornecido pelo National Institute for Medical Research de Hampstead, Inglaterra, oficialmente adotado pela Liga das Nações (3).

Uma unidade internacional equivale aproximadamente a 2 gamas de aneurina pura cristalizada. O peso de aneurina para produzir, nas condições experimentais acima, 1 mg. sêco de cogumelo, representa o que Schopfer denominou de unidade-Phycomyces ou seja de 0,005 y[1] (33).

O « Phycomyces » se desenvolve produzindo o mesmo peso da cultura com qualquer das preparações puras de aneurina em dóses equivalentes (31). A aneurina cristalizada ou melhor os preparados comerciais contendo dóses conhecidas dessa vitamina, podem tambem ser empregados dando resultados perfeitamente comparaveis entre si (Villela) (42).

A comparação entre a curva de peso fornecida pelo padrão internacional ou pela aneurina cristalizada e a curva de peso produzida pela substancia a ensaiar, permite estabelecer uma dosagem bastante precisa, desde que se tenha verificado, por ensaio prévio, qual a diluição conveniente. Se a quantidade de vitamina é excessiva, o resultado é falseado e os valores obtidos não mais exprimem a quantidade existente. O papel da aneurina sendo a de um catalizador na utilização do nitrogenio do meio (asparagina) é claro que existe uma dóse maxima além da qual a adição suplementar de vitamina não pode mais alterar o desenvolvimento do cogumelo.

Para a dosagem em peso, fazem-se diluições crescentes de modo a obter uma curva em que se tomam os seus valores maximos. Além desse ponto ha ligeira quéda que se deve ao excesso de vitamina.

Especificidade.

Os primeiros trabalhos de Schopfer faziam crêr que o « Phycomyces » não se desenvolvia senão quando a aneurina era adicionada ao meio de cultura sintetico. Mais tarde, porém, este autor observou que a destruição da aneurina pelo superaquecimento em meio alcalino não fazia perder a sua atividade sobre o cogumelo. Este fato foi posteriormente esclarecido quando foram empregados os produtos de desintegração da aneurina (tiazol e pirimidina). Nem a pirimidina (4-metil-4-amino-5-amino-metil-pirimidina) nem o tiazol (4-metil-5-(beta-oxietil)-tiazol) isolados são capazes de atuar como fatores de crescimento, mas quando adicionados conjuntamente eles se tornam ativos para o « Phycomyces ». Isso significa que o cogumelo é capaz de sintetizar a aneurina quando os

[1] 1 γ = 1 gama = 1 micrograma = 0,001 mgr.

componentes da aneurina se acham presentes. Á primeira vista, parece que o test perde a especificidade; de fato, deixa de existir completa especificidade, mas a adsorção com o kaolim ou a terra de infusorio no pH de 4,0 só se dá para a aneurina, nem o tiazol nem a pirimidina são adsorvidas, logo o valor do test persiste. Para a dosagem de produtos vitaminicos tem-se verificado perfeita concordancia entre este test vegetal e o test do pombo (Faguet) (6).

Outros microorganismos têm sido propostos como test para a evidenciação e dosagem da aneurina. O tripanosomideo « Strigomonas oncopelti » só se desenvolve quando a aneurina está presente (M. Lwoff) (17). Com as diluições da aneurina de 1×10^{-8} a 1×10^{-9} já aparecem culturas (18). A pirimidina e o tiazol não substituem a aneurina, nem isolados nem adicionados conjuntamente. A ação da aneurina é para esse protozoario muito mais especifica do que para o « Phycomyces ».

Desde que a vitamina é um fator indispensavel para muitos microorganismos (bacterias) (Knight) (11, 12, 13), (protozoarios) (Lwolff) (17, 18) e que as substancias pirimidinicas e tiazolicas não têm influencia, parece á primeira vista que estes microorganismos devam ser preferidos ao test de Schopfer-Jung como indicadores da presença de aneurima. Entretanto, a dificuldade em se obter uma cultura uniforme, além da impossibilidade de avaliar as variações quantitativas, tornam esses microorganismos improprios para um test de dosagem. A inoculação do meio com bacterias ou flagelados tem muita importancia, assim pequenas variações no numero de celulas inoculadas já fornece resultados discordantes, ao passo que o « Phycomyces » pode ser semeado por meio de emulsões de densidade diferente sem que o peso da colheita ofereça variações apreciaveis. Outra vantagem reside na medida do desenvolvimento da cultura que se torna muito dificil com os protozoarios e facil com um cogumelo de micelios aereos como é o « Phycomyces ». Nem o bios (inositol) nem o acido pantotenico de Williams têm ação sobre o « Phycomyces » (Schopfer, Meiklejohn) (32) (19).

Resultados.

A adsorção da aneurina existente no extrato aquoso do mate em pH 4.0, pela terra de infusorio ou pelo kaolim (pH 3.0), nos forneceu os resultados que passamos a relatar. As curvas de peso estabelecidas indicaram que 100 grs. de folhas contêm 60 a 280 y de aneurina. O test da fluorescencia tambem mostrou valores proximos a esses. Tanto o mate verde como o mate chamado « queimado » contém aneurina em concen-

tração proxima. Com o emprego do adsorbato de kaolim em dóses crescentes obtivemos curvas tipicas como exprime o grafico abaixo.

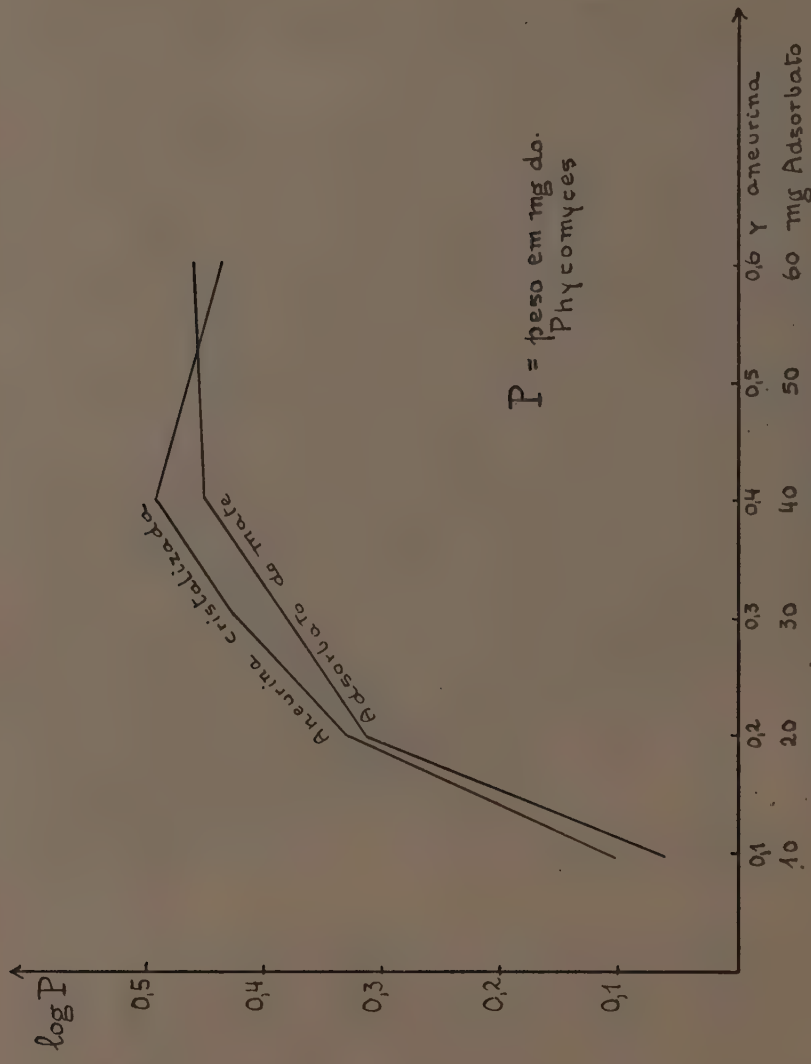


Grafico 5 — Curva de peso do "Phycomyces" com quantidades crescentes do adsorbato de-kaolim, em comparação com a curva de peso obtida com a aneurina cristalizada. Na linha das ordenadas figuram os log. de P (peso do cogumelo em mgrs).

A tecnica mais favoravel foi a do emprego de dóses crescentes do adsorbato.

ANALISE CROMATOGRAFICA.

Usamos o dispositivo de Mohler e Hämmerle (51) que nos forneceu uma coluna com tres zonas distintas. A primeira zona de cima de 4 cm., a segunda do meio e a terceira de baixo com 8 cm. cada uma. A primeira zona é incolor, a segunda verde e castanho-esverdeado, e a terceira incolor. A aneurina acompanha o pigmento na zona média, sendo tambem encontrada na camada inferior. O volume de liquido foi de 10 cc. e o tubo de 24 cm. de comprimento e 0,7 cm. de diametro. O adsorvente empregado foi a terra de infusorio.

DOSAGEM DA ANEURINA PELA REAÇÃO DO TIOCROMO (JANSEN).

Diversas reações coradas têm sido propostas para a identificação da vitamina B_1. Umas se baseiam na diazo-reação e suas modificações (Kinnersley e Peters, Prebluda e McCollum, Willstaedt), outra na reação com o iodeto de bismuto e potassio (Naiman), outras nas reações com o 2-6-dibromoquinona-cloro-imida (Raybin) e com o p-dimetil-amino-benzaldehido (Tauber) e por fim na fluorescencia do tiocromo (Jansen) (1) (8) (9) (27).

Quasi todas essas reações só dão resultados satisfatorios com soluções puras de aneurina. A unica que tem provado bons resultados nas determinações da aneurina em produtos biologicos é a do tiocromo de Jansen.

Em 1936, B. C. P. Jansen (8) (9) publicou um mélodo para a dosagem da aneurina tendo por base a fluorescencia produzida pelo tiocromo que se obtem depois de oxidar a vitamina. Esta tecnica foi em seguida aplicada á dosagem da aneurina nos liquidos biologicos (urina, sangue, liquor) (9) (45) (46) (49). Nós tivemos ensejo de aplicar esta tecnica á dosagem da aneurina do mate, obtendo valores concordantes com os encontrados para a tecnica de Schopfer (43) (47).

A tecnica por nós adotada foi a seguinte:

5 grs. de folhas de mate são extraidas a quente com 3 porções de agua distilada em ebulição num total de 100 cc., acidulada com acido acetico até o pH de 4.0. Filtra-se e tomam-se 10 cc. que se adicionam de 100 mg. de terra de infusorio (frankonite) ou melhor de kaolim puro lavado. Deixa-se na geladeira durante 1 hora, agitando-se frequentemente. Centrifuga-se e lava-se com uma solução de acido acetico a 1% e depois com etanol a 96°. O adsorbato é sêco na estufa a 100° e adicionado de 2 cc. de metanol e 1 cc. de soda a 30%. Agita-se e junta-se 0,8 cc. de ferricianeto de potassio a 1% e 12 cc. de isobutanol. Deixa-se em repouso

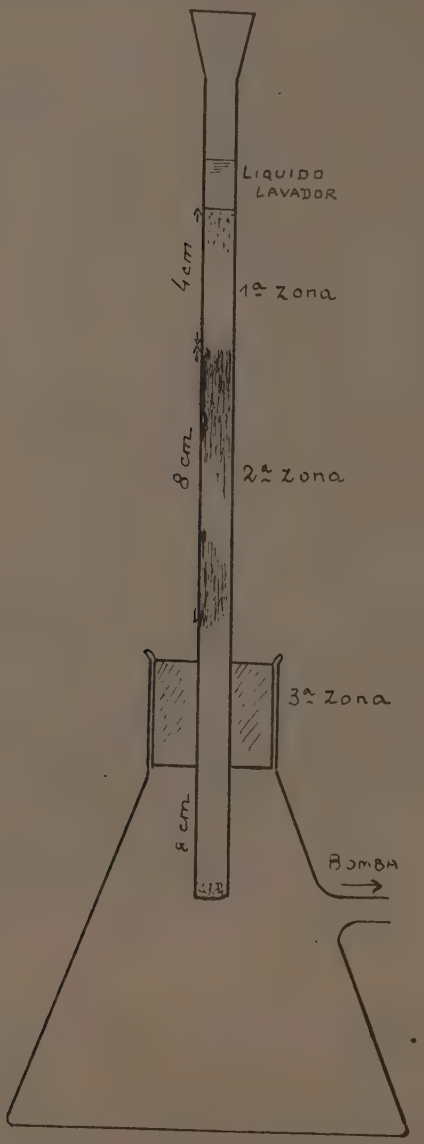


Fig. 1 — Coluna do adsorvente [terra de infusorio] com as diferentes camadas de cromatograma.

durante 1 hora ou centrifuga-se e retira-se a camada de isobutanol que acarreta o tiocromo, e submete-se á luz ultra-violeta em comparação com um padrão de aneurina tratado da mesma maneira. Usamos varios padrões contendo de 1 y a 5 y de aneurina sintetica (Benerva Roche). A intensidade da fluorescencia é medida tambem com mais precisão pelo fotometro Pulfrich de Zeiss adaptado a uma lampada de vapor de mercurio de Hanau. Neste caso mede-se a percentagem de luz transmitida ou absorvida e um unico padrão inicial é suficiente. As dosagens feitas com varias amostras de mate nos forneceram valores variaveis de 80 a 250 y para 100 grs. de folhas de mate sêcas. O mate verde contém em média quantidades superiores ás do mate sêco. Das amostras estudadas por nós, provenientes de varias fontes, sempre encontramos valores médios em torno de 100 y. O mate chamado queimado tambem contém aneurina em concentração próxima a esse valor.

ABSTRACT.

Studies on the determination of vitamin B (aneurin, thiamin) in the « tea » of Paraguay (yerba mate).

1) The infusion used as a beverage and known as tea of Paraguay or mate (Ilex paraguarensis, St. Hil.) contains vitamin B (aneurin).

2) Aneurin determinations were made on the infusion commonly used (water extract) and on the complete water and alcohol extracts. The presence of aneurin was detected in both extracts. For quantitative study aneurin was adsorbed from the extracts (pH 3.8-4.0) by means of fuller's earth and kaolin.

3) Animal tests with pigeons and mice (curative, preventive and maintenance of body weight) give positive but inconstant results. No exact quantitative values could be obtained with the animal test.

4) Schopfer-Jung test based on the development of the mould « Phycomyces blakesleeanus, Bgf » showed constant results. Regular growth curves were obtained with the adsorbate of kaolin and fuller's earth.

5) The thiochrome fluorescence test introduced by Jansen was applied to the detection of aneurin in the adsorbate and good

results were found which check closely with those encountered by the Schopfer-Jung test.

6) The determinations of aneurin by means of the Phycomyces and thiochrome tests gave values varying from 60 to 280 γ per 100 gr.

7) Green leaves are more rich in aneurin than dry ones.

BIBLIOGRAFIA

1) Bomskov, Ch.

1935. Methodik der Vitaminforschung — Georg Thieme — Leipzig.

2) Carter, C. W., Kinnersley, H. W. & Peters, R. A.

1930. Maintenance of nutrition in adult pigeon and its relation to torulin (vitamin B_1). Bioch. J., **24** : 1832.

3) Coward, K. H.

1938. Biological Standardization of Vitamins, W. Wood, Baltimore.

4) Cowgill, G. R.

1935. The vitamin B requirement of man, Yale Univ. Press — New Haven: 22-39.

5) Escudero, A., Sagastume, M., Senra, R. & Santorno, J.

1936. Sobre la presencia de ácido ascórbico (vitamina C) en la yerba mate (Ilex paraguayensis). Semana Med., **43** : 1868.

6) Faguet, M.

1937. Titrage de la vitamine B_1 par le test végétal. Étude comparative avec le test animal. Compt. R. Soc. Biol., **126** : 856.

7) Galvão, P. E. & Pereira, J.

1938. Sobre a oxidação do acido lactico no encefalo de animais normais e em avitaminose B_1. Localização da lesão quimica nos mamiferos e nas aves. Arch. Inst. Biol., **9** : 25.

8) Jansen, B. C. P.

1938. Chemische methoden zur Bestimmung der Vitamine und ihre praktische Bedeutung — Zeit. f. Vitaminforsch., **7** : 226.

9) Jansen, B. C. P.

1938. Quantitative Bestimmung von Aneurin (= Vitamin B_1) Zeit. f. Vitaminforsch., **7** : 239.

10) Karrer, W.

1937. Zur Bestimmung von Vitamin B_1 im menschlichem Harn. Helv. Chim. Acta, **20** : 1147.

11) Knight, B. C. V. G.

1937. The nutrition of «Staphylococcus Aureus». The activities of nicotin-amride, aneurin (vitamin B_1) and related compounds. Bioch. Jour., **31** : 731.

12) KNIGHT, B. C. V. G.

1937. The nutrition of «Staphylococcus Aureus»; nicotinic acid and vitamin B_1. Bioch. Jour., **31** : 731.

13) KNIGHT, B. C. V. G.

1938. The specificy of aneurin and nicotinamide in the growth of «Staph. Aureus». Bioch. Jour., **32** : 1241.

14) KON, S. K. & DRUMMOND, V. C.

1927. The physiological rôle of vitamin B. Bioch. J., **21** : 632.

15) KÖNIG, J.

1920. Chemie der Nahrungs-und Genussmittel sowie der Gebrauchs-gegenstände. Julius Springer, **2** : 560 e 851, **5** : 1920.

16) LEVENE, P. A. & VAN HOEVEN, B. J.

1924. The concentration of vitamin B_1. Jour. Biol. Chem., **61** : 129.

17) LWOFF, M.

1938. L'aneurine facteur de croissance pour les «Strigomonas». C. R. Soc. Biol., **128** : 241.

18) LWOFF, A. & DUSI, H.

1938. Culture de divers flagellés leucophytes en milieu synthétique. Compt Rend. Soc. Biol., **127** : 53.

19) MEIKLEJOHN, A. P.

1937. The estimation of vitamin B_1 in blood by a modification of Schopfer's test. Bioch. J., **31** : 1441.

20) MENDIVE, J. R.

1938. Sobre la presencia de ácido ascórbico en la yerba mate del Comercio. Rev. Inst. Bact., **8** : 400.

21) NARAYANAN, B. T. & DRUMMOND, J. C.

1930. The concentration of vitamin B_2. Bioch. Jour., **24** : 19.

22) OTERO, M. J.

1930. Las vitaminas en la «yerba mate». Arch. Soc. Biol., Montevidéo Suppl. Congr. Internac. Biol., **4** : 1026.

23) OTERO, M. J.

1938. Contribución al estudio de la acción de infusiones de yerba mate (Ilex paraguayensis) sobre enzimas que actuam en los procesos de oxidación en el organismo animal. An. Inst. Mod. Clin. Med.

24) OTERO, M. J.

1938. Contribución al estudio de la acción de infusiones de yerba mate en el metabolismo de los hidratos de carbono. An. Inst. Mod. Clin. Med.

25) OTERO, M. J.

1938. Contribución al estudio de los fermentos oxidantes de las hojas del Ilex paraguayensis (Yerba mate) — Idem. Idem.

26) Randoin, L. & Simmonet, H.

1927. La question des vitamines. Presse Univ. de France.

27) Raybin, H. W.

1938. A new color reaction of vitamin B_1 (Thiamin). Science, **88** : 35.

28) Salmon, W. D. & Guerrant, N. B.

1928. On the existence of two active factors in the vitamin B complex. J. B. Chem., **76** : 487.

29) Salmon, W. D., Guerrant, N. B. & Hay, T.

1928. The effect of Hydrogen ion concentration upon adsorption of the active factors of vitamin B complex by fuller's earth. J. B. Chem., **80** : 91.

30) Saraiva, M.

1934. Algumas considerações sobre o Mate. Bol. Mes. Camara Com. Arg. del Brasil, **1** : 5.

31) Schopfer, W. H.

1936. Étude de l'action auxogène des extraits de tissus animaux normaux et pathologiques sur le développement de Phycomyces. C. R. Acad. Sc. Paris, **202** : 236.

32) Schopfer, W. H. & Moses, W.

1936. Recherches sur la concentration et la séparation des facteurs de croissance de microorganisme contenus dans le germe de blé. Protoplasma, **26** : 538.

33) Schopfer, W. H. & Jung, A.

1938. Étude des organes d'animaux et en avitaminose B_1 au moyen du test Phycomyces. Établissement d'une microméthode. Zeit. f. Vitaminforsch., **7** : 143.

34) Schopfer, W. H. & Jung, A.

1936. Recherches sur la mesure de l'activité vitaminique B_1 à l'aide d'un microorganisme (Phycomyces). Compt. Rend. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève, **53** : 22.

35) Schopfer, W. H. & Rytz Jor., W.

1937. La ouate comme source de facteur de croissance de microorganisme. Arch. f. Microf., **8** : 244.

36) Seidell, A.

1922. Improved method for the preparation of vitamin-activated fuller's earth. U. S. Pub. Health Repts., **37** : 801.

37) Sherman, H. C. & Smith, S. L.

1931. The Vitamins. Chem. Catalog Co. N. Y. : 24-110.

38) Sherman, H. C. & Mc Arthur, E. H.

1927. A quantitative study of the determination of vitamin B. Jour. Biol. Chem., **74** : 107.

39) SIMMONET, H.

1933. Les vitamines B. Zeit. f. Vitaminforsch., **2** : 28.

40) SPRUYT, J. P.

1934. Comparative determinations of the antineuritic vitamin content of rice, made by experiments on the rice bird and by the rat tests. Arch. Néerl. Physiol., **19** : 295.

41) TANNER, F. W.

1924. The « Bios » Question. Chem. Rev., **1** : 397.

42) VILLELA, G. G.

1938. Sobre a dosagem da vitamina B_1 (aneurina) pela technica de Schopfer. O Hospital, **13** : 43.

43) VILLELA, G. G.

1938. Sur le dosage de l'aneurine (vitamin B_1) du maté par la téchnique Schopfer-Jung. Compt. Rend. Soc. Biol., **129** : 987.

44) VILLELA, G. G.

1938. Sur la présence d'un facteur de croissance (aneurine) dans l'infusion de thé constaté par le test de Schopfer-Jung. Compt. Rend. Soc. Biol., **129** : 997.

45) VILLELA, G. G.

1938. Vitamin B_1 in cerebrospinal fluid. Science, **89** : 251.

46) VILLELA, G. G.

1938. Sur l'emploi du test du Phycomyces pour le dosage de l'aneurine dans l'urine. Compt. Rend. Soc. Biol., **129** : 989.

47) VILLELA, G. G.

1939. Dosagem de vitamina B_1 na herva mate. Acta Med., **3** : 75.

48) WEHMER, C.

1931. Die Pflanzenstoffe. Fischer : 718.

49) WESTENBRINK, H. G. K. & GOUDSMIT, J.

1937. En chemische methode voor de bepaling van het aneurine (= vitamine B_1) in urine. Nederl Tijdsch. Geneesk., **81** : 2632.

50) WILLIAMS, R. J. & ROEHM, R. R.

1930. The effect of antineuritic vitamin preparations on the growth of yeasts. Jour. Biol. Chem., **87** : 581.

51) ZECHMEISTER, L. & CHOLNOKY, L.

1937. Die chromatographische Adsorptionsmethode. Julius Springer — Vienna.

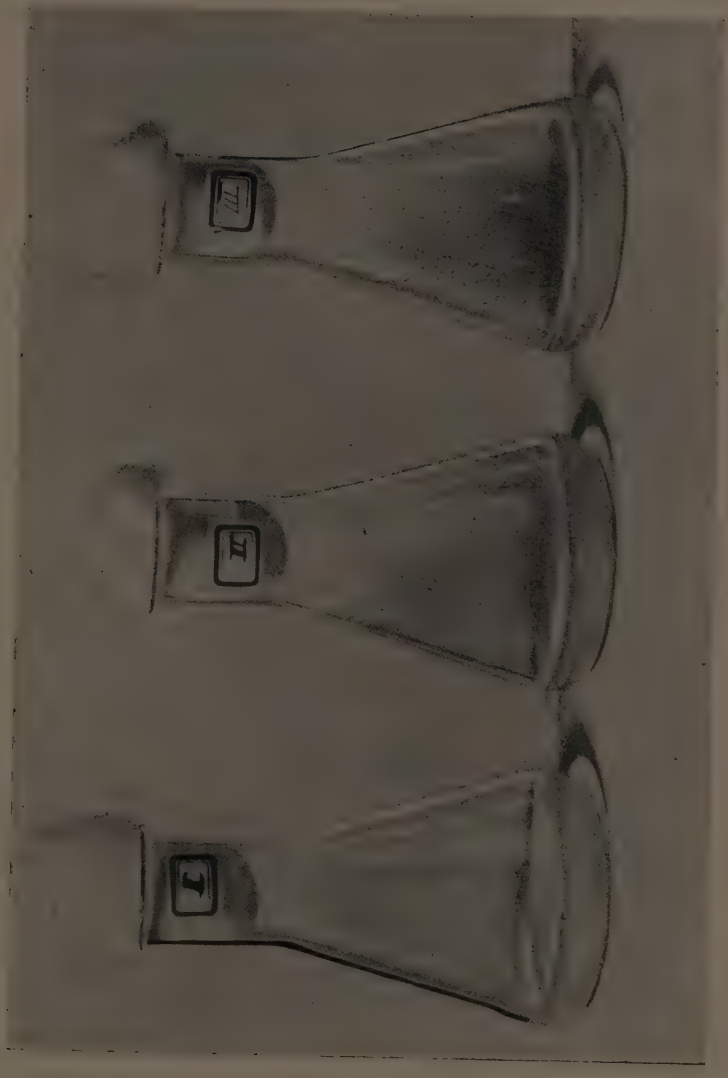
Estampa 1

Fig. 2 — Desenvolvimento do «Phycomyces» pela adição ao meio sintetico de 200 mgr. do adsorbato de kaolim e 100 e 200 mgrs. do adsorbato de terra de infusorio.

Villela: Vitamina B_1 na herva mate.

Estampa 2

Fig. 3 — Balões com dóses crescentes do adsorbato de kaolim.



Villela: Vitamina B_1 na herva mate.

Estampa 3

Fig. 3 — Balões com dóses crescentes do adsorbato de kaolim.

Villela : Vitamina B_1 na herva mate.

Hemoglobinometria e nivel de vida das populações *

I — Região do nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco)

por

W. O. Cruz

(Com 5 graficos no texto, 1 mapa e 2 estampas)

Após os nossos estudos sobre a anemia ancilostomótica (Cruz, 1932-1934), cujos principais resultados encontraram confirmação em trabalhos de outros autores (Suarez, 1933. Langen, 1933. Biggan & Ghalioungui, 1934. Rhoads & Castle, 1935. Plum, 1935), ficou bem patente a influencia da alimentação sobre a genese desta anemia. Para proseguimento deste nosso trabalho, era de interesse verificarmos « in loco » alguns pontos importantes na questão, porisso, aceitamos com grande interesse o convite do dr. E. Chagas, para percorrermos o nordeste do Brasil em viagem de estudos.

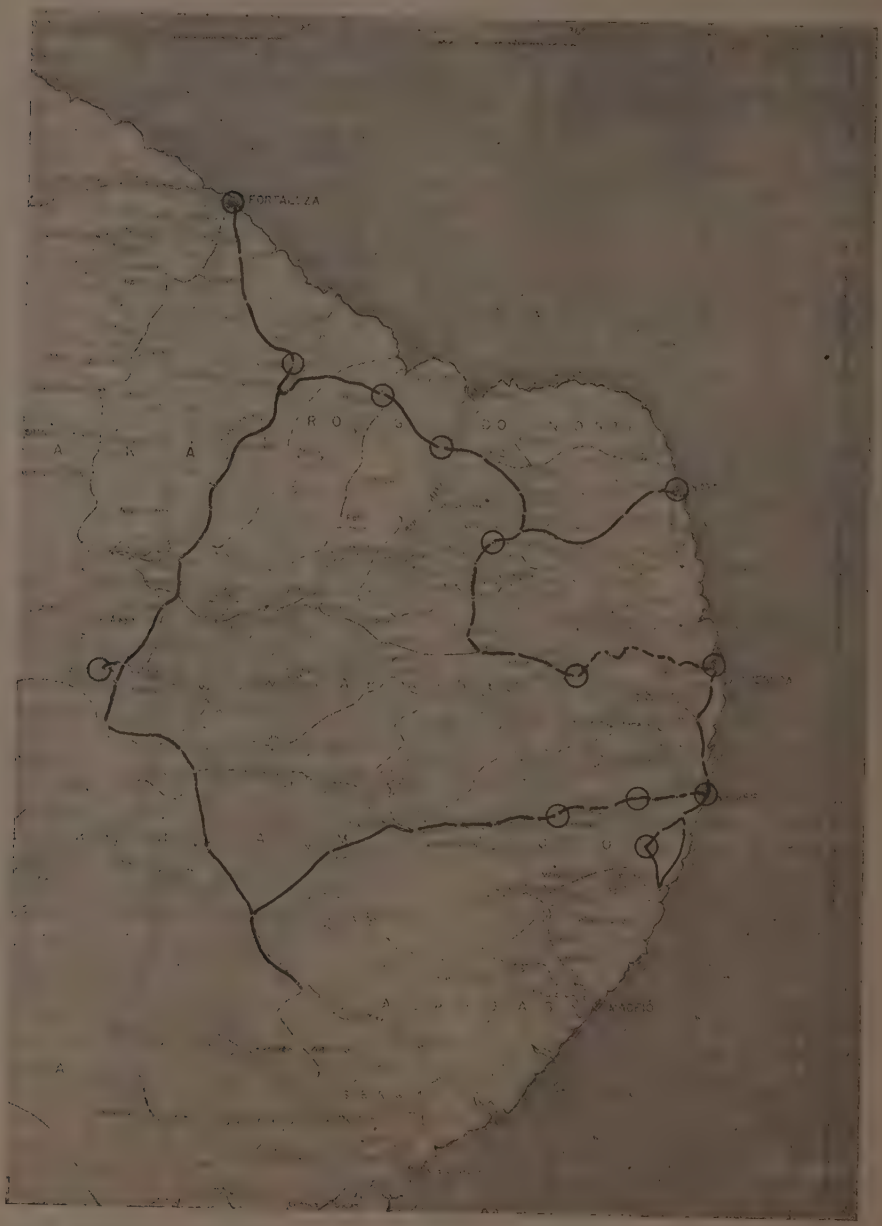
A viagem foi feita em automovel, pelas estradas de rodagem construidas pelo Departamento de Obras Contra a Sêca. Partimos de Fortaleza a 13 de julho, voltando ao mesmo ponto a 8 de agosto, completando o circuito pelo interior do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagôas e Ceará. Detalhes sobre o tempo de permanencia nos locais e trajeto percorrido, são apresentados no quadro 1 e no mapa da viagem.

Como iamos percorrer zonas completamente heterogeneas quanto á condição de vida do povo, encontrando nas cidades agrupamentos de condição economica superior, por conseguinte, regime alimentar normal, e no campo, ao contrario, condições precárias de alimentação e de vida em geral, nos ocorreu verificar de uma possivel correlação entre a riqueza no sentido economico e no sentido hematico do termo.

As condições de nutrição têm importancia muito mais imediata para o sangue e orgãos hematopoieticos que para outros setores da economia.

---

* Recebido para publicação a 2 de Janeiro de 1939 e dado á publicidade em Agosto de 1939.



Mapa da viagem segundo o trajeto Fortaleza-Natal-João Pessôa-Recife-Jatobá-Crato-Fortaleza. As determinações foram feitas nas cidades assinaladas por circulo.

Todo o metabolismo hematico repousa diretamente nas chamadas substancias hematogenas, existentes em reserva no organismo ou presentes nas substancias alimentares. Além desta função hematogena, o regime alimentar regula a longevidade das hematias. Si o sangue e orgãos hematopoieticos, são sistemas diretamente dependentes das condições alimentares e sendo a alimentação, fruto da condição economica do individuo ou das possibilidades produtivas da região, não nos pareceu absurdo supor que o aspéto sanguineo, refletisse, «grosso modo», as condições diferentes destes individuos.

Com o tempo restrito que dispunhamos na presente viagem, achámos preferivel abandonar problemas especialisados sobre a patogenia da anemia ancilostomotica, para abordarmos assunto mais geral, como seja este de verificar a correlação entre o estado hematico e as condições gerais de vida em agrupamentos humanos selecionados.

Quadro 1

Cidade ou povoação	Chegada Data	Chegada Hora	Horas de viagem	Kms. percorridos	Saída Data	Saída Hora	Corridas no local
Fortaleza	—	—	—	— —	13-7	9.00	0 kms.
Russas	13-7	14.00	5.00	211 kms.	14-7	15.00	18 »
Limoeiro	14-7	18.00	3.00	64 »	15-7	8.00	6 »
Lagôa do Rocha	15-7	8.50	0.50	36 »	15-7	8.50	0 »
Faixa Branca	15-7	9.00	0.10	8 »	15-7	9.00	0 »
Mossoró	15-7	12.00	3.00	60 »	16-7	15.00	1 »
Assú	16-7	18.00	3.15	77 »	17-7	16.00	48 »
Lagôa Cauan	17-7	16.45	0.45	9 »	17-7	17.00	0 »
Angico	17-7	17.30	0.30	42 »	17-7	18.00	1 »
Pixoré	17-7	19.00	1.00	26 »	17-7	19.00	0 »
Cerro Corá	17-7	22.50	3.50	54 »	18-7	11.45	7 »
Queimada	18-7	12.30	0.45	16 »	18-7	12.30	0 »
Sta. Cruz	18-7	14.00	1.30	72 »	18-7	14.00	0 »
Zé Antonio	18-7	15.40	1.40	39 »	18-7	16.00	0 »
Macaíba	18-7	16.50	0.50	66 »	18-7	17.00	0 »
Natal	18-7	18.00	1.00	29 »	21-7	13.30	109 »
Currais Novos	21-7	17.45	4.15	202 »	22-7	14.45	1 »
Acarí	22-7	15.25	0.40	29 »	22-7	15.25	0 »
Parelhas	22-7	15.50	0.45	31 »	22-7	16.00	0 »
Junco	22-7	16.45	0.15	8 »	22-7	16.45	0 »
Equador	22-7	16.30	0.30	40 »	22-7	16.30	0 »
Barra	22-7	17.45	1.00	11 »	22-7	17.45	0 »
Joazeirinho	22-7	18.50	0.20	10 »	22-7	19.00	0 »
Soledade	22-7	20.00	1.00	29 »	22-7	20.00	0 »
Campina Grande	22-7	22.00	2.00	62 »	24-7	9.45	33 »
Alagôa Nova	24-7	10.40	0.55	30 »	24-7	11.25	1 »

Alagôa Grande	24-7	12.20	0.55	28	»	24-7	13.30	0	»
Alagoinha	24-7	14.10	0.40	17	»	24-7	14.10	0	»
Molungú	24-7	14.30	0.20	14	»	24-7	15.00	0	»
Araçá	24-7	15.30	0.30	22	»	24-7	15.30	0	»
Sapé	24-7	15.45	0.15	11	»	24-7	16.30	3	»
Espirito Santo	24-7	16.45	0.15	20	»	24-7	16.50	0	»
Sta. Rita	24-7	17.00	0.10	14	»	24-7	17.00	0	»
João Pessôa	24-7	17.10	0.10	10	»	25-7	14.00	10	»
Cupissura	25-7	15.00	1.00	52	»	25-7	15.00	0	»
Goiana	25-7	16.00	1.00	19	»	25-7	16.30	0	»
Recife	25-7	19.00	2.30	80	»	1-8	14.00	201	»
Vitória	1-8	14.30	0.30	53	»	1-8	14.30	0	»
Gravatá	1-8	15.15	0.45	35	»	1-8	15.45	0	»
Caruarú	1-8	16.45	1.00	54	»	2-8	12.00	13	»
S. Caetano	2-8	12.30	0.30	21	»	2-8	12.30	0	»
Entre Pesqueira e Barra	2-8	13.00	0.30	48	»	2-8	13.00	0	»
Lagôa Rodagem	2-8	15.00	2.00	26	»	2-8	15.00	0	»
Rio Branco	2-8	16.00	1.00	39	»	2-8	16.30	1	»
Mirim	2-8	17.40	1.10	83	»	2-8	18.15	0	»
Const. Açu. Poço. Cruz	2-8	18.30	0.15	7	»	3-8	7.15	1	»
Espirito Santo	3-8	9.10	1.55	60	»	3-8	9.15	0	»
Jatobá	3-8	11.10	1.55	62	»	3-8	12.20	0	»
Joxotó (limite)	3-8	15.20	3.00	39	»	3-8	15.20	0	»
Paulo Afonso	3-8	16.30	1.10	33	»	4-8	7.35	0	»
R. Moxotó (lim. Pern.-Alag.)	4-8	8.30	0.55	33	»	4-8	8.30	0	»
Jatobá	4-8	10.00	1.30	37	»	4-8	12.10	0	»
Floresta	4-8	14.50	2.40	73	»	4-8	15.40	1	»
Nazareth	4-8	19.40	4.00	70	»	4-8	20.30	0	»
Rio S. Domingos	4-8	22.00	1.30	17	»	5-8	6.45	0	»
Vila Bela	5-8	8.30	1.45	27	»	5-8	10.25	0	»
Bom Nome	5-8	11.25	1.00	39	»	5-8	11.30	0	»
Belmonte	5-8	12.30	1.00	23	»	5-8	12.45	0	»
Limite Pernam.-Ceará		13.00	0.15	15	»	5-8	13.00	0	»
Macapá	5-8	14.15	1.15	15	»	5-8	14.30	0	»
Jardim	5-8	16.20	1.50	40	»	5-8	16.30	0	»
Barbalha	5-8	18.00	1.30	38	»	5-8	18.00	0	»
Joazeiro	5-8	18.35	0.35	13	»	5-8	18.35	0	»
Crato	5-8	19.05	0.30	14	»	6-8	12.10	1	»
S. Pedro	6-8	16.00	2.00	25	»	6-8	16.00	0	»
Lavras	6-8	18.40	2.40	64	»	6-8	19.00	0	»
Icó	6-8	20.30	1.30	61	»	6-8	21.30	0	»
Jaguaribemirim		23.55	2.25	83	»	7-8	8.15	0	»
Russas	7-8	17.50	9.35	162	»	7-8	20.40	0	»
Cristais	7-8	22.30	1.50	53	»	8-8	7.00	0	»
Fortaleza	8-8	11.00	4.00	91	»				
			106.45	3127	Kms.			457	Kms.

Média horaria	29,3	kms.
Gasolina consumida	597	litros
Média de kms. por litro de gasolina	6	kms.

MÉTODOS

Para a execução do presente trabalho, o hemoglobinometro de Dare é o único aparelho prático de precisão adequada aos fins propostos. Este aparelho e o método de Talqvist, constituem os únicos processos de dosagem de hemoglobina com sangue em natureza sem qualquer diluição ou transformação cromática por meios químicos. O principio do hemoglobinometro de Dare, consiste na comparação de uma camada de sangue em natureza, com padrão de vidro corado em vermelho sanguineo de intensidades diferentes. Este principio foi posto em prática de modo comodo e simples por Dare (1900), quando descreveu o hemoglobinometro que leva o seu nome. A nosso conhecimento, o primeiro trabalho experimental chamando a atenção sobre a significação prática dêste aparelho, foi de Senty (1922). Este autor, comparou diversos hemoglobinometros tomando como padrão o método da hematina ácida de Cohen e Smith, concluindo que o hemoglobinometro de Dare é instrumento bastante prático nas determinações de hemoglobina entre 20 e 65%.

Como se poderá vêr na estampa 2 (fig. 1), o aparelho consta de tres peças ajustaveis no momento de usar:

a) um manubrio contendo o aparelho de iluminação (fig. 2).

b) a parte principal do aparelho (fig. 3) contendo:

1) uma lâmina de vidro corado em vermelho sanguineo de espessura progressivamente crescente, com graduação porcentual na borda e graduação em gramas na face posterior;

2) um sistema de prismas para ajuste de imagens no campo de observação;

3) a chamada pipeta automática, constituida por duas lâminas de vidro, uma opaca e outra transparente, contidas num sistema metálico de suportes por um parafuso que as juxtapõem numa das extremidades, deixando a outra separada por uma pequena fresta de 180 micra de espessura.

c) uma lupa de visada tornando facil a comparação entre o sangue e o prisma padrão.

O aparelho vem acompanhado de um perfurador de dedo e um sistema simples de iluminação á vela para caso de descarregamento da pilha elétrica.

A evolução dêste aparelho desde sua descrição inicial por Dare, foi relativamente pequena. Haughwont (1929) mostrou a importancia de se controlar a espessura da fresta capilar, chamando a atenção dos fabricantes sobre a necessidade de padronisar definitivamente este dado do aparelho. O autor refere diferenças de 52 micra na espessura de duas determinadas pipetas, diferenças estas, correspondentes a um desvio de 24% na dosagem da hemoglobina. Melhoramentos de detalhes consistiram: na eletrificação do aparelho de iluminação, padronisação pelo método de Van Slyke, considerando 100% igual a 16 grs. de hemoglobina, e a adaptação do prisma para ajustamento das imagens no campo visual de observação. Modificação importante, segundo proposta de Sanford, da clínica de Mayo, consistiu em tornar o prisma padrão 15% mais fino na região superior, « o que veiu melhorar decididamente o aparelho » (Senty).

Baseados na padronisação acima referida, pelo método volumétrico de Van Slyke, executámos nosso trabalho sem nenhuma padronisação prévia do aparelho. Os resultados encontrados estavam muito abaixo daqueles habitualmente verificados no homem normal. Padronisámos então nosso aparelho, pelo método preconisado por Heilmeyer (1933), no espectrofotometro de Pulfrich, obtendo resultados mais de acôrdo com o nivel clássico de hemoglobina no homem. O método de Heilmeyer havia anteriormente sido padronisado pela dosagem de ferro no sangue, segundo o método de Wong (1928), sendo por conseguinte, este ultimo método aquele tomado por padrão. Os resultados encontrados estão representados no gráfico 1.

O limite de erro do aparelho foi procurado com o maximo cuidado. A leitura não se faz com a mesma facilidade nas diferentes regiões do prisma comparador. Abaixo de 20% a côr do padrão é cada vez mais diferente da côr do sangue anemiado, tornando-se quasi impossivel a leitura abaixo de 15% de hemoglobina. A leitura é comoda, facil e rapida na região compreendida entre 20 e 60%. De 60% em diante a leitura dificulta-se, sendo necessario um exercicio continuado do aparelho para permitir precisão ainda razoavel, se bem que já á custa de um certo esforço e de repetidas leituras.

O erro de medida foi determinado em 20 amostras de sangue num

total de 200 cuidadosas observações (quadro 2). O resultado aproximado foi de 5% como erro relativo. Não é por conseguinte um aparelho de alta precisão, mas para trabalho estatistico esse limite de erro ainda é perfeitamente aceitavel.

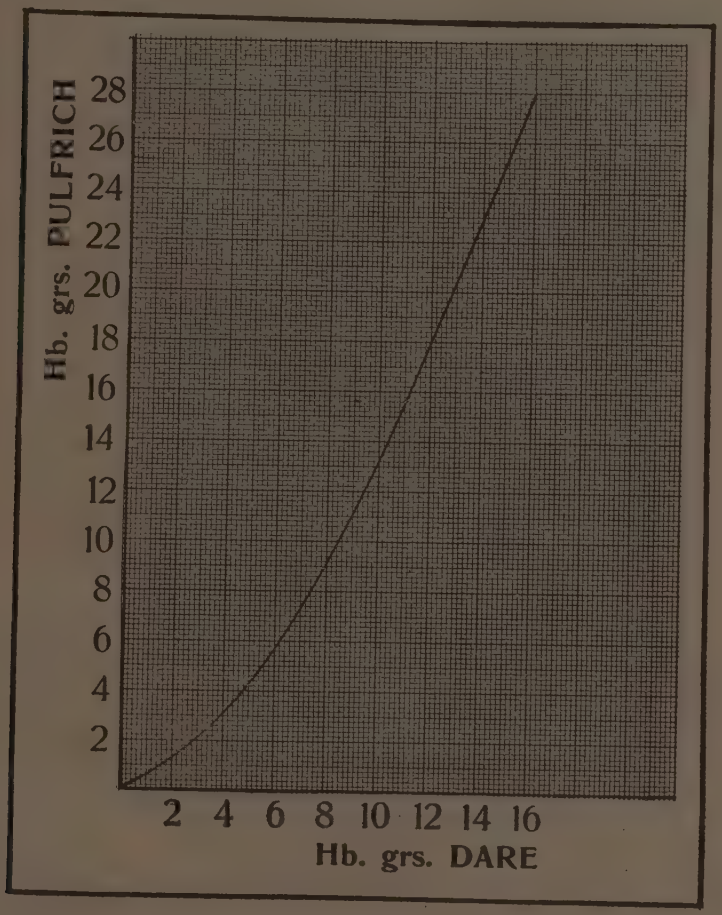


Grafico 1

Quadro 2

Erro de medida no hemoglobinometro de Dare

N. de amostras	DETERMINAÇÕES										MEDIA	Erro absoluto	Erro relativo (o/o)
1	23	24	23	26	26	25	23	26	27	25	24,8	1,8	7,3
2	71	68	74	66	77	72	73	75	75	73	72,4	4,6	6,4
3	40	38	41	40	41	40	42	41	40	40	40,3	2,3	5,4
4	89	88	92	89	92	92	90	89	90	91	90,2	2,2	2,5
5	27	27	30	30	28	29	30	29	29	30	28,9	1,9	6,6
6	34	35	36	35	38	36	37	38	36	36	36,1	1,9	5,3
7	42	43	44	44	44	44	47	45	45	45	44,3	2,7	6,1
8	28	29	30	29	28	27	27	29	27	28	28,2	1,8	6,4
9	32	33	34	33	35	31	33	33	33	32	32,9	2,1	6,4
10	32	32	34	34	34	33	34	35	35	35	33,8	1,2	3,6
11	31	29	31	31	32	31	31	32	31	32	31,1	2,1	6,8
12	55	55	56	58	55	58	56	55	56	58	56,2	1,8	3,2
13	54	56	60	60	59	55	58	57	60	57	57,9	3,9	6,8
14	102	103	100	97	100	98	99	101	100	100	100,0	3,0	3,0
15	98	99	99	101	99	102	100	101	99	99	99,7	1,7	1,7
16	64	64	64	65	65	62	64	66	64	65	64,3	2,3	3,6
17	81	80	76	77	82	78	75	76	78	80	78,3	3,7	4,7
18	77	75	73	76	73	72	74	72	75	71	73,8	3,2	4,3
19	64	63	64	67	65	64	65	64	67	65	64,8	2,2	3,4
20	61	64	61	62	63	64	62	63	64	63	62,7	1,7	2,7
Media	200 verificações em 20 amostras										51,5	2,4	4,8 o/o

Algumas modificações de importancia prática nos ocorreram após cerca de 3000 observações com este aparelho:

1) Na aquisição de um numero elevado de observações o maior desperdicio de tempo está na lavagem das pipetas automáticas, por isso, julgámos indispensavel trabalhar, com, pelo menos, tres pipetas automáticas e seus respectivos suportes.

2) A dificuldade de leitura nos extremos da escala, como assinalámos anteriormente, poderia ser definitivamente afastada, com o uso de pipetas de espessura diferente. Tres pipetas seriam suficientes; uma de espessura identica á das atualmente empregadas, para a leitura entre 20 e 60%; uma segunda pipeta com o dobro da espessura da anterior, para leitura de sangue anemiado, abaixo de 20%; e finalmente, uma terceira, de espessura igual á metade da primeira, para sangues com taxa elevada de hemoglobina. Para este fim, bastaria construir a lâmina de vidro opaco da pipeta automática em tres espessuras diferentes, na extremidade de contato com a lâmina transparente. A leitura final seria feita simplesmente multiplicando-se o resultado achado, pelo coeficiente caracteristico de cada espessura.

A relação entre as diferentes espessuras, obedece á curva abaixo, resultado de 34 observações cuidadosas e construida pelo método dos mínimos quadrados.

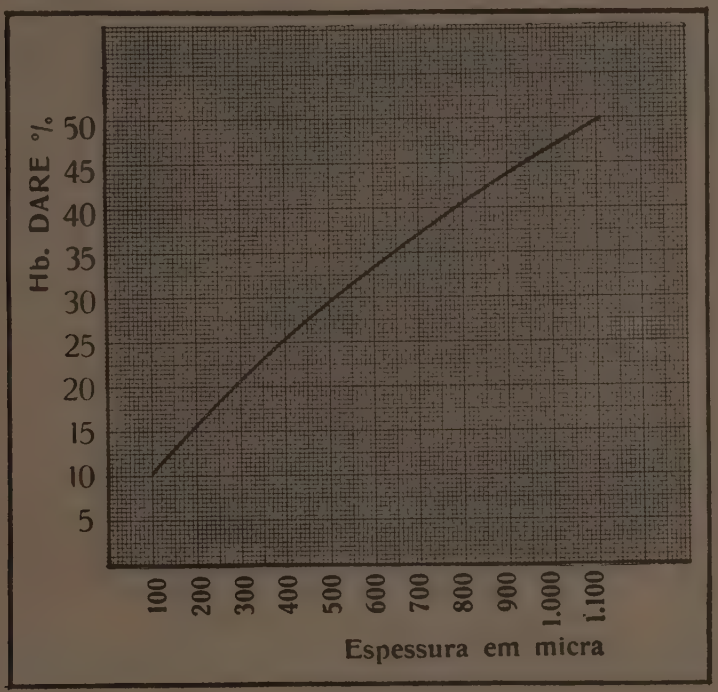


Grafico 2

3) Para trabalho no campo, ou mesmo em hospitais, no qual fosse conveniente aumentar as condições de portabilidade do aparelho, seria util a adaptação de uma alça metalica na região superior do manubrio, para uso de correia tornando possivel o transporte a tiracolo. Neste caso tambem seria desejavel a substituição do encaixe do manubrio, por parafuso, para fixar mais convenientemente estas duas partes do aparelho.

4) Seria de toda a conveniencia a colocação de diafrágma entre a lâmpada e a pipeta automática, para se poder reduzir a luminosidade exagerada produzida pelas pilhas novas.

5) O ideal de rapidez e comodidade com este aparelho, seria obtido, se possivel fosse se conseguir a substituição da lupa por um sistema fotoeletrico de leitura.

RESULTADOS

Para a obtenção de material ótimo quanto ao afastamento das condições economicas, impunha-se, sem duvida, que a seleção dos individuos de condição economica inferior fosse feita no campo, de habitação em habitação. Entretanto, o consumo de tempo para estas pesquisas em habitação, tornou inexequivel a seleção deste material ideal. Tivemos que nos contentar em examinar grupos em oposta condição economica, dentro de aglomerações naturais, tais como colegio, usinas, fabricas, grupos escolares, quarteis, etc.

As observações cujos resultados são apresentados na tabela geral e no gráfico 3, foram executadas nas seguintes cidades:

Ceará		
	Fortaleza	694
	Russas	230
	Crato	100
Rio G. do Norte		
	Natal	447
	Currais Novos	90
	Assú	86
	Mossoró	75
Paraíba		
	João Pessoa	100
	Campina Grande	100
Pernambuco		
	Recife	250
	Ribeirão	100
	Tapéra	100
	Caruarú	100
Pará		
	Belém	300
Outras observações durante o percurso		282
Total de observações		3.054

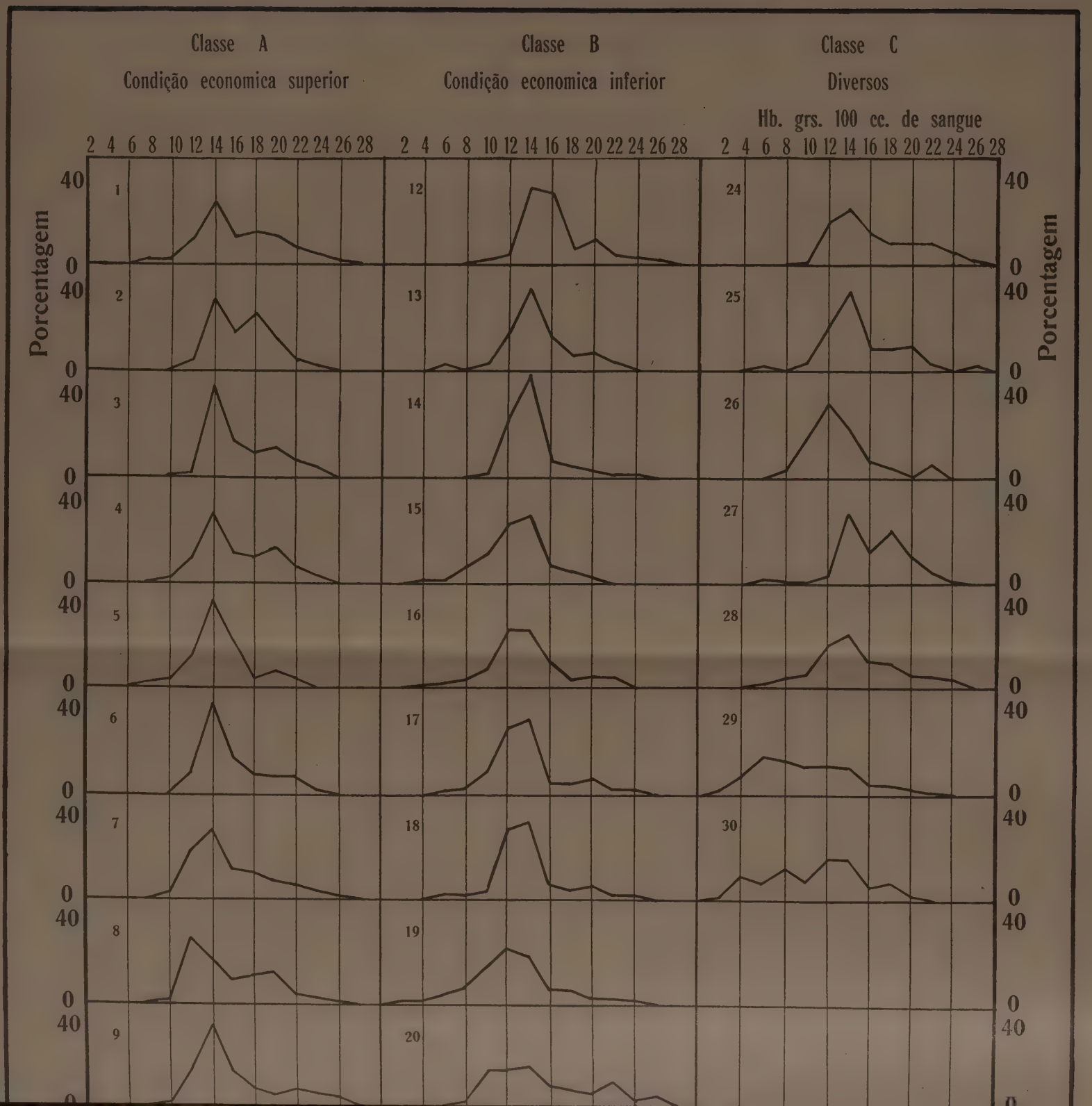
Tabela geral

N. dos agrupamentos	Grafico *	Nome do agrupamento	Cidade	Edade	Casos	Sexo	M.—E. Pm.	D. P.—E. Pm.	Min.	Mo.	C. V.	S.	CLASSE 1-2,9	3-4,9	5-6,9
CONDIÇÕES ECONOMICAS SUPERIORES (1051 observações)															
1	1	Grupo Escolar	Crato	7—14	100	F.	16,62 ± 0,26	3,82 ± 0,18	16,60	16,56	22,9	0,01	0	0	0
2	2	Col. Imac. Conceição Externato	Fortal.	16—19	100	F.	16,54 ± 0,18	2,68 ± 0,12	16,43	16,18	16,2	0,13	0	0	0
3	3	Col. Militar Externato	Fortal.	14—19	100	M.	16,64 ± 0,22	3,26 ± 0,15	15,74	13,94	19,6	0,82	0	0	0
4	4	Gin. Diocesano Externato	Mossoró	12—18	75	M.	16,50 ± 0,23	3,42 ± 0,16	15,62	13,86	20,7	0,77	0	0	0
5	5	Grupo Escolar	Assú	6—19	86	MF.	14,72 ± 0,19	2,64 ± 0,13	14,38	13,36	17,9	0,51	0	0	0
6	6	Col. Militar Internato	Fortal.	14—19	100	M.	16,02 ± 0,21	3,10 ± 0,15	14,90	12,76	19,3	1,08	0	0	0
7	7	Col. Nobrega Externato	Recife	9—15	100	M.	15,76 ± 0,24	3,54 ± 0,17	14,68	12,72	22,5	0,31	0	0	0
8	8	Escola Doméstica	Natal	15—22	100	F.	15,60 ± 0,25	3,66 ± 0,17	14,62	12,66	23,5	0,80	0	0	0
9	9	Col. St. Antonio Ext. Internato	Natal	8—20	100	M.	15,40 ± 0,23	3,42 ± 0,16	14,46	12,52	22,2	0,84	0	0	0
10	10	G. Esc. J. Nabuco Externato	Caruarú	6—14	100	MF.	15,62 ± 0,24	3,56 ± 0,17	14,52	12,32	22,8	0,93	0	0	0
11	11	Grupo Escolar	C. Novos	6—18	90	MF.	16,08 ± 0,23	3,48 ± 0,17	14,70	11,94	21,6	1,19	0	0	0
				MEDIA			15,95 ± 0,22	3,32 ± 0,16	15,16	13,53	20,8	0,67	0	0	0
CONDIÇÕES ECONOMICAS INFERIORES (1144 observações)															
1	12	Guarda Civil Desaquartelada	Fortal.	19—45	100	M.	14,98 ± 0,19	2,75 ± 0,13	15,48	16,48	18,4	0,55	0	0	0
2	13	Col. Imac. Conceição Orfanato	Fortal.	3—10	100	F.	14,66 ± 0,21	3,06 ± 0,15	14,22	13,34	20,9	0,43	0	0	2
3	14	Col. Imac. Conceição Internato	Fortal.	14—20	94	F.	14,04 ± 0,15	2,28 ± 0,11	13,76	13,20	16,2	0,37	0	0	0
4	15	Posto Saúde	Natal	15—45	100	MF.	12,62 ± 0,19	2,80 ± 0,13	12,72	12,92	22,2	0,01	0	1	1
5	16	Fab. Tecidos Apipucos	Recife	15—50	100	MF.	13,96 ± 0,25	3,68 ± 0,17	13,50	12,76	26,4	0,33	0	1	2
6	17	Esc. Pública Beberíbe	Recife	7—13	100	MF.	13,52 ± 0,21	3,04 ± 0,15	13,22	12,62	22,5	0,29	0	0	1
7	18	Fab. Tecidos Bodocongó	C. Gran.	15—40	100	MF.	13,78 ± 0,19	2,88 ± 0,14	13,38	12,58	20,9	0,42	0	0	1
8	19	Grupos Escolares	J. Pessoa	6—14	100	MF.	12,82 ± 0,26	3,88 ± 0,19	12,56	12,04	30,3	0,20	1	1	3
9	20	Gr. Escolar Rocas	Natal	8—14	100	MF.	14,84 ± 0,30	4,40 ± 0,21	13,90	12,02	29,6	0,64	0	0	0
10	21	Usína Açúcar Cucaú	Ribeirão	20—40	100	M.	13,60 ± 0,21	3,18 ± 0,15	13,80	12,04	23,4	0,49	0	0	1
11	22	Engenho S. Bento	Tapéra	12—40	100	M.	12,18 ± 0,24	3,58 ± 0,17	12,00	11,64	29,4	0,15	0	1	7
12	23	Casa da Providencia	Recife	4—12	50	MF.	11,84 ± 0,19	2,84 ± 0,13	11,72	11,48	24,0	0,13	0	0	2
				MEDIA			13,59 ± 0,22	3,20 ± 0,15	13,29	12,76	23,7	0,33	0	0	2
				DIFERENÇA			2,44	0,11	1,91	0,80	3,1	0,35	0	0	2
DIVERSOS (677 observações)															
1	24	Inst. Nazaret Externato	Belém	10—16	100	M.	16,64 ± 0,27	4,00 ± 0,19	15,62	13,68	24,0	0,74	0	0	0
2	25	Fab. Tecidos Perseverança	Belém	15—60	100	M.	14,94 ± 0,24	3,60 ± 0,17	14,22	12,78	24,1	0,60	0	0	2
3	26	G. Esc. Julio Chermont	Belém	4—16	100	MF.	13,16 ± 0,23	3,40 ± 0,16	12,58	11,42	25,8	0,51	1	0	0
4	27	Colonia Pescadores	Fortal.	20—45	100	M.	16,40 ± 0,22	3,28 ± 0,16	16,38	16,34	20,0	0,02	0	0	2
5	28	Moradores Cidade	Russas	4—60	130	MF.	14,84 ± 0,28	4,12 ± 0,20	15,00	15,62	27,8	0,08	0	0	2
6	29	Moradores Zona Rural	Russas	4—60	100	MF.	9,90 ± 0,29	4,34 ± 0,21	11,00	18,60	43,8	2,00	2	9	18
7	30	Hosp. Miguel Couto	Natal	20—60	47	MF.	10,86 ± 0,30	4,44 ± 0,21	11,21	11,91	40,9	0,24	2	11	9

* Os graficos dos agrupamentos acham-se reunidos no grafico geral (grafico 3).

S (Hb. grs. em 100 cc. de sangue.)

7-8,9	9-10,9	11-12,9	13-14,9	15-16,9	17-18,9	19-20,9	21-22,9	23-24,9	25-26,9
2	2	11	28	12	16	15	8	5	1
0	0	5	33	17	26	14	4	1	0
0	0	1	43	16	12	14	9	5	0
0	1	12	33	13	12	17	9	3	0
2	3	15	43	22	5	7	3	0	0
0	0	10	42	18	10	9	9	2	0
0	2	21	32	13	12	9	7	3	1
0	2	31	21	11	13	14	5	2	1
0	3	18	40	15	9	5	6	2	2
0	3	16	41	12	12	4	5	5	1
0	1	14	41	8	10	17	5	3	1
0	2	14	36	14	13	11	6	3	1
0	2	5	35	33	8	12	4	0	1
0	5	19	39	15	8	9	3	0	0
0	3	28	50	9	6	2	1	1	0
8	15	29	31	8	6	1	0	0	0
3	9	28	28	12	4	6	7	0	0
3	11	31	36	5	5	6	1	1	0
1	7	34	37	7	5	6	1	1	0
8	16	27	24	6	6	4	2	1	0
3	19	19	20	10	8	7	11	1	2
2	16	30	25	13	5	4	3	1	0
8	18	32	18	11	3	2	0	0	0
10	20	50	10	4	0	0	4	0	0
4	12	28	29	11	5	5	3	1	0
4	10	14	7	3	8	6	3	2	1
0	1	19	25	16	10	10	10	7	2
1	4	21	36	10	10	11	3	0	2
3	19	34	23	8	5	1	6	0	0
1	1	3	32	16	24	13	7	1	0
5	7	21	24	13	11	7	6	4	0
16	14	15	14	5	4	2	1	0	0
15	9	19	19	6	8	2	0	0	0


Classe A
Condição economica superior
Classe B
Condição economica inferior
Classe C
Diversos
Hb. grs. 100 cc. de sangue
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
Porcentagem
40
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
12
13
14
15
16
17
18
19
20
24
25
26
27
28
29
30

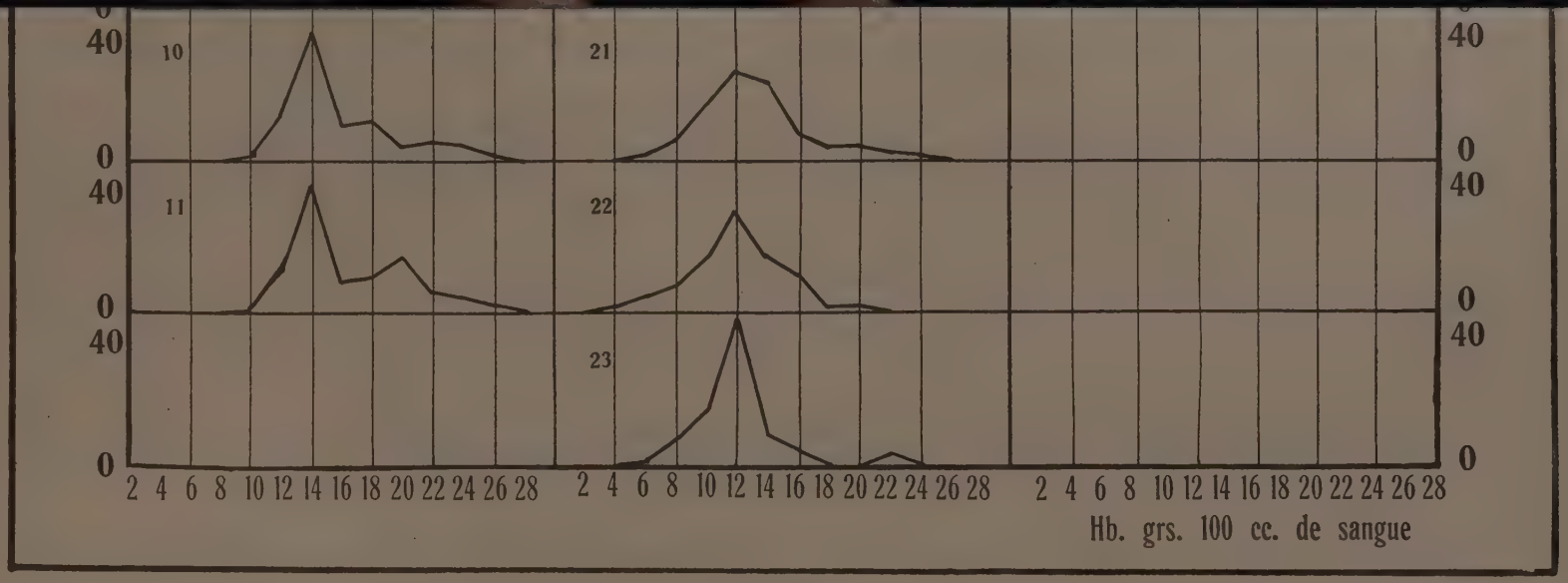

40
0
10
21
11
22
23
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28
Hb. grs. 100 cc. de sangue

Grafico 3

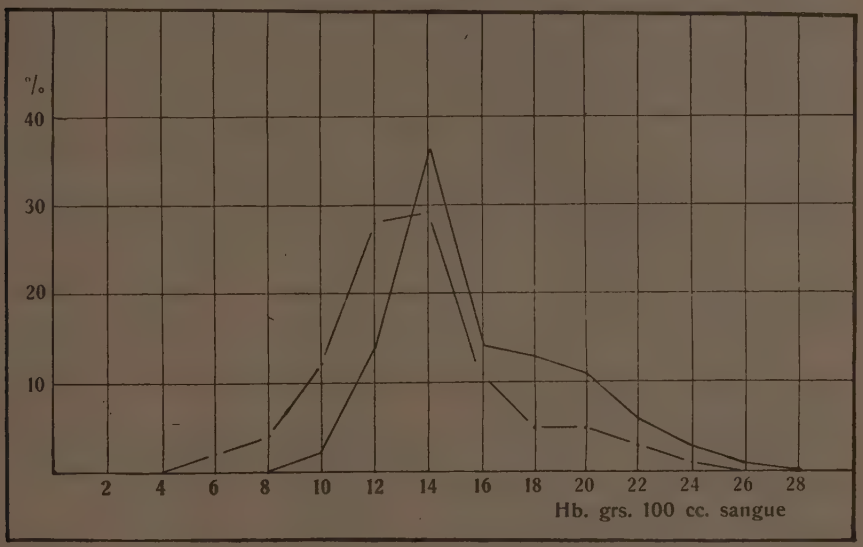


Gráfico 4 — A linha cheia representa o trabalho estatistico sobre 1051 casos de individuos de condição economica superior. A linha interrompida 1144 individuos de condição economica inferior. A maior riqueza hemoglobinica na classe economicamente superior resalta de maneira bem clara.

INTERPRETAÇÃO E DISCUSSÃO

Interpretação dos resultados estatisticos:

Os resultados numéricos apresentados na tabela geral, deixam margem bem curta a interpretações, eles concluem por si mesmos.

Média: — A diferença de 2,44 grs. de hemoglobina em 100 cc. de sangue entre as médias dos agrupamentos observados, não deixa duvida que a quantidade de hemoglobina é influenciada notavelmente pelas condições gerais de vida do individuo na região nordestina.

Desvio padrão: — Esta medida de dispersão mostrou-se praticamente igual em ambos os agrupamentos, o que significa que a condição deficiente verificada entre os individuos da classe economica inferior repercute igualmente em todo o grupo, sem qualquer preferencia pelos individuos que normalmente têm quantidade de hemoglobina menor. O gráfico 4 demonstra bem uma simples translação da curva normal para

a esquerda, sem nenhuma modificação em sua dispersão, mostrando que a causa de empobrecimento hemático atinge indiferentemente a todos os individuos.

Mediana e moda: — Ambas nitidamente diminuidas no grupo economicamente inferior. O gráfico 3 mostra claramente a distribuição da moda. No grupo A, de condição economica superior, a moda encontra-se em 14 grs. com uma unica exceção (gráfico 8). No grupo B, de condição economica inferior, a moda acha-se em 12 grs. ou com grande tendencia para este ponto.

Coeficiente de variação: — Apresenta-se geralmente mais alto no grupo B, onde em 50% dos casos é mais elevado que o maior coeficiente observado no grupo A (23,5%).

Coeficiente de asimetria: — Geralmente maior no grupo A, onde 65% dos casos apresentou-se mais elevado que o mais alto coeficiente observado no grupo B (0,64).

Distribuição da frequencia: — Nas classes mais elevadas (24 a 26 grs.) a frequencia é quasi sempre nula no grupo B, enquanto que raramente falta no grupo A. Nas classes mais baixas a frequencia no grupo A é nula na classe 6, muito rara na classe 8; já no grupo B, é raramente ausente nas classes 6 e 8. Muito caracteristicas apresentam-se as classes centrais 10 e 12. Nos agrupamentos estudados, bastam estas duas classes para a classificação num dos grupos A ou B. Em nenhum caso, foi observado no grupo A uma porcentagem maior de 5% na classe 10 grs.; no grupo B, unicamente dois casos apresentaram-se com menos de 5% na respetiva classe (estes dois agrupamentos, como veremos adiante, poderiam ser considerados como intermediarios entre os grupos A e B). No grupo A, só dois casos apresentaram-se como mais de 19% na classe 12. No grupo B, unicamente um caso foi verificado com porcentagem menor de 19% nesta mesma classe.

Estas caracteristicas que acabámos de referir, retiradas de 22 agrupamentos, nós as consideramos mais como indicações que verdadeiramente caracteristicas. Numeros tipicos, que sirvam como seguro limite de separação, só poderão ser conseguidos após observação de um maior numero de agrupamentos, com o futuro proseguimento dos estudos. Provisoriamente, poderemos considerar as cifras abaixo como caracteristicas de cada grupo (quadro 3).

Quadro 3

	Media	Coef. Variação	Coef. Asimetria	FREQUENCIA	
				Classe 10	Classe 12
Grupo A	+ 15 grs.	— 25 °/o	+ 0,70 (65 °/o dos casos)	— 5 °/o	— 19 °/o (80 °/o dos casos)
Grupo B	— 15 grs.	+ 25 °/o (50 °/o dos casos)	— 0,70	+ 5 °/o	+ 19 °/o

CASOS PARTICULARES:

Na procura do material a examinar, a escolha da condição economica era simplesmente intuitiva ou baseada nos conhecedores do local. Todos os agrupamentos escolhidos como classe de condição economica superior, mostraram, sem nenhuma exceção, taxa elevada de hemoglobina. Entretanto, dos agrupamentos seleccionados como de condição inferior, alguns apresentaram cifras normais de hemoglobina. Assim aconteceu nos grupos escolares de Assú, Currais Novos e Crato. Haviamos escolhido estes grupos escolares como agrupamentos de condição economica inferior, observámos, porém, de inicio, a presença de um grupo heterogeneo, creanças ricas e pobres em proporções diferentes, segundo as cidades. Em nossos apontamentos, classificámos estes grupos escolares de cidades do interior, como sendo agrupamentos de condição economica mixta. De fato, um inquerito mais detalhado nos mostrou que um grupo escolar é, nestas cidades, o melhor estabelecimento educacional existente, quando não é o unico. Significa isto, que estas escolas são preenchidas, de preferencia, pelos filhos das pessoas mais influentes do local, por conseguinte, de condição economica melhor. Nas capitais dos estados percorridos, o grupo escolar com seu ensino gratuito, reúne unicamente creanças de condição economica inferior, e, neste caso, as cifras hemoglobinicas revelaram sempre valores baixos.

Outro caso particular, semelhante ao descrito acima, foi encontrado no Internato Colegio Imaculada Conceição, em Fortalesa. Eram moças de condição economica inferior, internadas já de um a quatro anos, neste colegio dotado de instalações e regime alimentar verdadeiramente excelentes. Tambem, neste caso, adotámos uma classificação provisoria de condição economica mixta, tendo a determinação da Hb. revelado valores médios.

Caso semelhante a este verificámos em Belém do Pará, na fabrica

de tecidos, Perseverança. O aspéto hemático indicava uma condição intermediaria de vida entre o operariado desta fabrica. Pela pratica que tinhamos das fabricas do nordeste, este resultado nos pareceu bastante surpreendente. Indagámos sobre as condições do salario, verificando ser o salario médio destes operarios, cerca de duas a tres vezes mais elevado que o das fabricas nordestinas. A alimentação destes homens, tambem era surpreendente. Pelas referencias que faziam, alimentavam-se de carne duas vezes ao dia. Assinalemos que a carne é um alimento relativamente barato nesta região, pela proximidade de zona de criação de gado, e por controlar o governo o seu preço em nivel baixo (1$600 o quilo de carne verde).

Importante aquisição obtida com o método do presente trabalho, foi feita em Fortalesa, quando inquirimos sobre a condição hemática dos pescadores locais. Estes individuos têm sob o ponto de vista hematologico uma importancia essencial, porque sua comida principal — o peixe — é um alimento hematologicamente pobre, usado juntamente com o pão e leite nas rações dos animais que se procura conservar experimentalmente em nivel hemático baixo.

No caso dos pescadores de Fortalesa um inquerito alimentar sumário mostrou uma alimentação quasi exclusiva de peixe, acompanhada raras vezes de tomate e rapadura. A alimentação carnea era nula, citando-se casos de verdadeiras intoxicações, quando um destes pescadores usava da carne como alimento.

Este fato compreende-se facilmente, pois os jangadeiros do norte constituem um núcleo profissional hereditario. As creanças desde tenra idade, praticam nas jangadas junto aos pais, e se alimentam desde cedo á base quasi exclusiva de peixes.

O resultado do exame foi completamente oposto ao que se podia esperar: uma distribuição normal da curva hemoglobinica com uma das maiores médias observadas (16,4 grs.).

Novas informações colhidas no local sobre o regime alimentar veiu esclarecer completamente este resultado. Ha entre esses homens, uma preferencia acentuada pelo fígado de um peixe que denominam Cangulo (Monacanthideum sclerodermi). Esta preferencia fica bem assinalada quando ha acúmulo de alimento. Neste caso o fígado deste peixe é dificilmente desperdiçado. Estes individuos vivem por conseguinte com uma alimentação quasi que de tratamento de anemia perniciosa, tal o gosto e a facilidade que constitue para eles a obtenção do fígado de Cangulo.

Nas zonas recentemente invadidas pela malaria, verificámos em

detalhe a cidade de Russas. Aí os resultados apresentaram-se particularmente demonstrativos, porque, neste caso, observamos realmente a classe mais pobre da região, procurando no campo, os individuos a estudar, de casa em casa.

A cidade de Russas consta de tres ruas principais á margem de um carnaúbal a 1 km. de distancia do rio Jaguaribe. A tres kms. da cidade, já dentro do carnaúbal, encontra-se o que se pode chamar a zona rural de Russas. A epidemia de malaria, nesta cidade, atingiu uma intensidade máxima: na zona rural não foi observado nenhum homem indene, e dentro da cidade era extremamente raro encontrar-se individuo são. A diversidade da condição economica entre a cidade e o campo, tornou-se ainda mais evidente neste caso, dentro de uma situação de pânico creada pela malaria. Na zona rural de Russas grassava a mais completa miseria, a falta de medicamento e principalmente a falta de alimento, eram problemas que encontravamos em quasi todas as habitações.

A determinação hemoglobinica mostrou claramente a diferença hematica do agrupamento zona rural e do agrupamento cidade, como se vê claramente no gráfico abaixo.

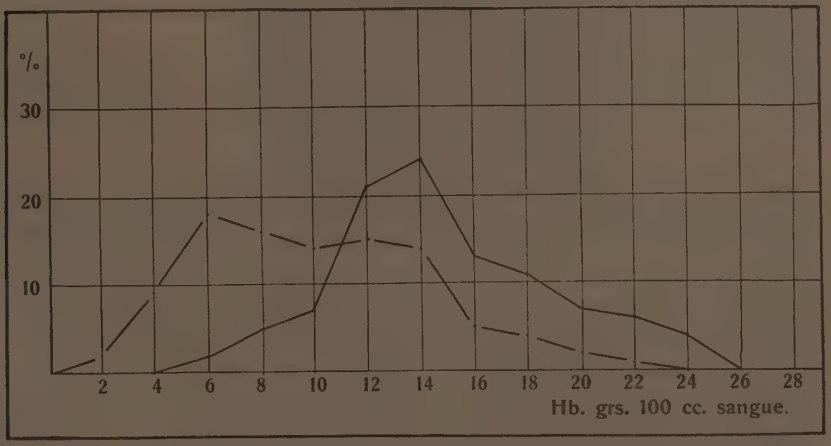


Gráfico 5 — A linha cheia representa o trabalho estatistico sobre 130 observações de individuos moradores na cidade de Russas; a linha interrompida 100 observações de moradores na zona rural da mesma cidade. Os resultados foram obtidos durante grave epidemia de malaria; o gráfico demonstra a maior repercussão do mal nos moradores da zona rural, de mais baixa condição economica.

ANEMIA ANCILOSTOMOTICA:

Sobre a incidencia da anemia ancilostomotica grave capaz de produzir os conhecidos sintomas da doença, as verificações na recente viagem ao nordeste confirmam os resultados descritos pelos autores modernos.

Em 1.159 casos, de individuos em condição economica superior, não observámos um unico caso de anemia ancilostomotica, ao contrario, em cerca de 1.300 casos de individuos de condição economica oposta, verificámos perto de 2%, casos graves de ancilostomose, distribuidos entre os seguintes locais:

Quadro 4

LOCAL	No. de observações	CIDADE	ANEMIA ANCILOSTOMOTICA (Hb abaixo de 8 grs.)	PERCENTAGEM o/o
Fab. Apipucus	100	Recife	4	4 o/o
Eng. S. Bento	100	Tapéra	9	9 o/o
Esc. Pub. Beberibe	100	Recife	1	1 o/o
Grupo Esc. J. Pessoa	100	J. Pessoa	9	9 o/o
Fab. tec. Bodocongó	100	C. Grande	1	1 o/o
Gr. Esc. Rocas	100	Natal	1	1 o/o
Posto Saúde Natal	100	Natal	1	1 o/o
Zona rural Russas	130	Russas	2	1,5 o/o
Outros agrupamentos em condição economica inferior	444		0	0
	1274		28	2,2 o/o

As elevadissimas porcentagens de certos locais (9% em Tapéra e João Pessoa), indicam que uma pesquisa orientada no sentido único de procurar casos graves de ancilostomose, nas zonas mais propicias ao desenvolvimento do parasita, podem dar resultados surpreendentes quanto á distribuição desta anemia.

A anemia ancilostomotica grave não se desenvolve em individuos de condição economica superior, mais pela bôa condição alimentar que pela dificuldade de contagio. De fato, as possibilidades de contagio, entre os individuos de condição economica superior no nordeste do Brasil, não são pequenas. E' preciso atentar, que condição economica superior, em certas cidades do interior nordestino, é condição unicamente melhor que da classe mais sem recursos, não querendo isto dizer que estes individuos possúam os mesmos recursos do que se poderia denominar de condição superior numa grande cidade.

Dos numerosos casos que observamos, os mais interessantes foram os dos individuos apresentados nas fotografias (1 a 5). O primeiro caso (foto 1), foi verificado na zona rural de Russas, em plena epidemia de malária. Era um caso provavelmente puro de ancilostomose, com aspéto hematico de uma anemia fortemente hipocrômica (hematias 1.300 mmc.; Hb. = 1,3 grs.).

O aspéto de cachexia extrema deste doente é bem visivel na fotografia, que tambem serve, de passagem, para ilustrar a miseria desta região. Este doente recusou a medicação marcial, vindo a falecer 15 dias depois.

Fig. 1

O segundo caso, tambem da zona rural de Russas é interessante pela presença de um grande edema nos membros e na face (vêr fotos ns. 2 e 3). Como o primeiro era um caso extremo de anemia hipocrômica (hematias 910.000 mms. Hb. aproximadamente 2 grs.). Depois de 4 dias de medicação marcial (1 gr. de ferro reduzido por dia), desappareceram completamente os edemas (vêr fotos ns. 4 e 5), resultado que vem confirmar fato por nós publicado anteriormente (Cruz, 1934).

Infelizmente este doente, já a caminho da cura, veiu a falecer cerca de um mês após iniciado o tratamento, de um ataque epileptoide que sofria habitualmente.

ANEMIA DO GADO:

Incidentemente tivemos ocasião de verificar uma epizootia de origem puramente hematica, causando grande mortandade nas criações do nordeste. A criação de gado no Ceará é bastante diminuta, mal conseguindo abastecer os mercados de carne das principais cidades do estado. Grande quantidade do gado é importado de outros estados por via maritima ou terrestre pelo interior de Goiaz. Tivemos ooprtunidade de conversar com um criador que importava do estado de S. Paulo. Os resultados da viagem eram danosos para o gado jovem; os bezerros chegavam enfraquecidos e morriam em grande maioria. Pelos sintomas descritos e pelo fato da doença se iniciar durante a viagem, supusemos tratar-se da conhecida anemia alimentar do gado, recentemente estudada em detalhes pelos autores neo-zeelandeses e americanos (Neal & Becker, 1933. Filmer, 1933. Underwood, 1934. Archibald, Kucinski, Brooke & Freeman, 1938.)

A titulo de experiencia dosámos a hemoglobina dos animais e escolhemos um dos mais tipicos para uma prova terapêutica:

Raça: holandês com crioulo.
Idade: 5 1/2 meses.
Peso: 22 kg.
Hematias: 2.500.000
Hb.: 2 grs.

Aspeto hematico de uma intensa anemia hipocrômica. Para termo de comparação, tomámos a hemoglobina de um bezerro sadio e vivendo no mesmo local: Hb. 9,8 grs.

Segundo o criador, apresentava este animal os sintomas habituais aos bezerros que sucumbiam á doença: grande apatia, dificuldade de se ter em pé, marcada inapetencia, diarréia.

Este bezerro anemico tomou 2 grs. diarias de ferro reduzido durante 35 dias, mas unicamente de fórma constante, nos primeiros 15 dias.

De volta de nossa viagem o aspéto do animal transformára-se. Era grande a sua vivacidade, o apetite voraz, e o aspéto geral ótimo.

O exame hematologico revelou:

Hematias: 3.300.000 mmc.
Hb.: 6,2 grs.
Peso: 48 kgs.

O aspéto hematico é ainda anormal, provavelmente devido á inconstancia na administração do medicamento. Entretanto, o enorme aumento de peso e a modificação do aspéto geral, junto á evidente regeneração hematica, são fatos bastantes para mostrar ter a epizootia referida, como causa provavel, uma anemia de origem carencial. Provavelmente, esta anemia grassa em varias outras regiões do estado do Ceará, tendo nós mesmos observado caso bem tipico em Cristais (Hb. 4 grs.), meio caminho entre Fortaleza e Russas.

Por informes, soubemos que a mesma mortandade de bezerros, ainda em maior grau, existe nas creações do Estado do Piauí, dificultando a prosperidade da pecuaria nesta região. Um estudo detalhado desta anemia, procurando verificar as condições locais, estabelecendo os programas profilático e terapêutico, seria sem duvida de um grande interesse científico e de real significação economica.

PROSEGUIMENTO DOS ESTUDOS:

As conclusões do presente trabalho têm quasi todas um caráter provisorio. A verificação de funcionamento aceitavel, de um método como este, apresentado pela primeira vez neste estudo, requer uma documentação maior e mais variada, que aquela que nos foi possivel fazer durante a presente viagem ao nordeste. Apesar de termos reunido 30 agrupamentos diferentes num total de 3.054 observações, os resultados ainda não nos inspiram uma total confiança. Em primeiro logar, iremos verificar parceladamente, por sexo e idade, a quantidade de hemoglobina de individuos nas melhores condições de vida possiveis, representantes da mais alta classe economica do país: para isso, estudaremos em detalhe numerosos casos na capital da Republica e na cidade de S. Paulo. A seguir, o nosso plano é determinar o afastamento das condições hematicas representadas pela quantidade de hemoglobina, nas classes sociais mais afastadas economicamente.

A região sul do país será o nosso próximo campo de trabalho, principalmente na zona de criação de gado, logar de grande interesse hematologico, porque a carne é aí um alimento ao alcance de todos. Depois passaremos para a zona central do país, nas regiões de minas de ferro (Estado de Minas Gerais), zona de criação de gado em Mato Grosso, sertão da Baía; terminariamos no norte (Amazonas e Pará), procurando aí, se possivel, examinar tribus semi-civilisadas que mantenham ainda condições alimentares proprias.

SUMARIO

Procurou-se verificar na região nordeste do Brasil, em cêrca de 3.000 observações, a relação existente entre a condição de vida de uma população e a sua riqueza hemoglobinica.

Empregou-se para esse fim o hemoglobinometro de Dare, do qual se apresenta um estudo detalhado sobre suas caracteristicas e se propõe algumas modificações julgadas de importancia para futuras utilisações do aparelho em trabalhos desta natureza.

Verificou-se boa correlação entre a riqueza hemoglobinica e riqueza das populações, no sentido economico da palavra, quando se experimenta num numero de casos que justifique um racional tratamento estatistico. As causas desta correlação não foram procuradas: é discutida unicamente a significação do método como test, para verificar as condições de vida de uma região.

Incidentemente, verificou-se novamente que a anemia ancilostomotica só póde desenvolver-se em individuos de condição economica deficiente.

Verificou-se, em certas regiões do nordeste, uma epizootia muito provavelmente de origem carencial, provocando anemia grave, responsavel por grande mortandade de bezerros.

Apresenta-se finalmente um plano para o proseguimento do trabalho, com o fim longinquo de levantar um mapa hematico do Brasil, segundo regiões geograficas e condições economicas das populações.

CONCLUSÕES

1) O hemoglobinometro de Dare mostrou-se aparelho extremamente prático e com precisão suficiente para pesquisa estatística da quantidade de hemoglobina.

2) Na região nordeste do Brasil, verificou-se uma boa correlação entre a quantidade de hemoglobina e as condições economicas das populações estudadas.

3) A dosagem de hemoglobina tomada em um agrupamento homogeneo de individuos quanto á sua condição de vida e em numero suficientemente grande de casos, parece ter significação como « test » permitindo inquirir sobre o nivel de vida do dito agrupamento.

4) Incidentemente verificou-se, mais uma vez, que a anemia ancilostomotica só aparece em individuos de nutrição deficiente, não tendo sido verificado nenhum caso em individuos de condição oposta.

Durante o transcurso da viagem obtivemos grandes facilidades para o nosso estudo devido ao auxilio de colegas e pessôas a quem aqui agradecemos: *Fortaleza*: — Drs. Herbert Antunes, Iwan Porto, Dr. Vossio, Irmã superiora do Colegio Imaculada Conceição. *Natal*: — Drs. V. Konder, A. China, D. Dulce F. Pontes. *Currais Novos*: — Drs. Mariano e Muniz. *João Pessôa*: — Dr. Scorzelli. *Recife*: — Sr. Interventor Agamenon Magalhães, Drs. Otavio de Freitas, A. Bica, Gercino Pontes, Aggeu Magalhães, Lourinaldo Gouvêa, Srs. Othon Bezerra Melo, Luiz Cardozo Ayres. *Crato*: — Dr. Valença. *Belém*: — Drs. Souza Castro, L. Castro Ferreira.

Ao Dr. Evandro Chagas agradecemos ter-nos proporcionado a viagem e o material para trabalho e á Dra. S. Hasselmann o auxilio prestado na parte de estatistica.

BIBLIOGRAFIA

Archibald, J. G., Kucinski, K. J., Brooke, R. O. & Freeman, S. L.

1938. Nutritional anemia in cattle in Southeastern Massachusetts. J. Dairy Sci., **21** : 59.

Biggan & Ghaloungui

1934. Ancilostoma anemia and its treatment by iron. Lancet, **227** : 229.

Cruz, W. O.

1932. Hipótese sobre a patogenia da anemia na ancilostomose. Bras. Med., **46** : 593.

1933. Da medula ossea na ancilostomose. Mem. Inst. Osw. Cruz, **27** : 423.

1934. Patogenia da anemia ancilostomotica. I — Portadores de parasitos — Relação entre a atividade do helminto e a deficiencia de ferro na genese da doença. Mem. Inst. Osw. Cruz, **28** : 391.

1934. Patogenia da anemia na ancilostomose. II — Causas determinantes dos fenomenos regenerativos e degenerativos nessa anemia e contribuições para elucidar o seu mecanismo intimo. Mem. Inst. Osw. Cruz, **29** : 263.

1934. Patogenia da anemia na ancilostomose. III — Modificações hematicas e organicas, provocadas pelas simples eliminação do Ancilostomo e do Necator, em individuos fortemente anemiados. Mem. Inst. Osw. Cruz, **29** : 487.

Dare, A.

1900. A new hemoglobinometer. Philadelphia Med. Jour., **6** : 557.

Filmer, J.

1933. Enzootic Marasmus of cattle and sheep. Austral. Veter. J., **9** : 163

HAUGHWONT, F.

1929. A source of inconstant error in the Dare hemoglobinometer. J. Lab. Clin. Med., **14** : 659.

HEILMEYER

1933. Medizin Spektrophotometrie: pg. 86.

LANGEN, C.

1933. De Oorzaak der Anaemie bij Ankilostomiasis. Gen. Tijd. v. Noder. Ind., **73** : 592.

NEAL, W. M. & BECKER, R.

1933. The composition of foodstuffs in relation to nutritional anemia in cattle. J. Agric. Res., **47** : 249.

PLUM, D.

1935. Observations on Ankilostomiasis and anemia in Kenya, with special reference to the Digo and Embu Districts. East Afr. Med. J., **12** : 162.

RHOADS, C., CASTLE, W., PAYNE, G. & LAWSON, H.

1935. Hookworm anemia; etiology and treatment with especial reference to iron. Am. J. Hyg., **20** : 291.

SENTY, E.

1922/23. A comparative study of various methods of hemoglobin determination. J. Lab. Clin. Med., **8** : 591.

SUAREZ, R.

1933. Clinical aspects of uncinarasis. Puerto Rico. J. Pub. Healt. & Trop. Med., **8** : 299.

UNDERWOOD, E.

1934. Enzootic marasmus. Austral. Veter. J., **10** : 83.

WONG, S. Y.

1928. Colorimetric determination of iron and hemoglobin in blood Jour. Chem., **77** : 409.

Estampa 1

Figs. 2 e 3 — Anemia ancilostomotica grave. Hematias 910.000 mmc. Hemoglobina menos de 2 grs. 100 cc. sangue. Grande edema nos membros e na face.

Figs. 4 e 5 — Após 4 dias de medicação marcial (1 gr. de ferro reduzido por dia), verificou-se o desaparecimento dos edemas.

Plate 1

Figs. 1 & 2 — Serious hookworm anemia case. Red blood cells 910.000 cmm. Hemoglobin: less than 2 grams per 100 cc. of blood. Large edema on the face and limbs.

Figs. 4 & 5 — After 4 days of iron treatment (1 gram of reduced iron a day) the disappearance of edemæ is patent.

Fig. 2

Fig. 4

Fig. 3

Fig. 5

Cruz: Hemoglobinometria e populações do nordeste.
Hemoglobinometry and northeastern populations.

Estampa 2

Hemoglobinometro de Dare (fig. 1) aparelho constituido por tres peças ajustaveis: um manubrio contendo o aparelho de iluminação (fig. 2); a parte principal do aparelho (fig. 3) contendo um prisma comparador, pipeta automatica e escalas graduadas; uma lupa de visada (fig. 4) para comoda comparação entre o sangue e o prisma padrão.

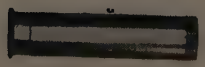
Plate 2

Dare's hemoglobinometer (fig. 1), an apparatus consisting of three adjustable parts: a handle, containing the lighting device (fig. 2), the main part of the apparatus (fig. 3) with a comparison prism, automatic pipette and graduated scales; and a lens (fig. 4) to afford an easy comparison between the blood and the standard prism.

1

2

3



4

Cruz: Hemoglobinometria e populações do nordeste.
Hemoglobinometry and northeastern populations.

Hemoglobinometry and living standards of populations

I — Northeastern zone: Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba and Pernambuco

by

W. O. Cruz

Translated by O. Cavalcanti

In a recent investigation trip to Northeastern Brazil, while crossing regions utterly different as to the living conditions of its inhabitants, the idea came to us of verifying a possible correlation between the hematic peculiarities and the general conditions of local populations. Starting with the notion that the blood and hematopoietic systems are directly dependent on alimentary conditions, which are in themselves consequences of the individual economic level — it did not seem to us absurd that the hematic feature of the individual could reflect at large his particular standard of life.

METHODS

For the purpose of the task we had in mind, Dare's hemoglobinometer is the only convenient apparatus having enough precision to fit the ends to be attained. That appliance and the Talqwist method are the sole processes of hemoglobine dosage with natural blood, without dilution or color shifting through chemical procedure. The principle of Dare's hemoglobinometer consists in the comparison between one layer of natural blood and a piece of glass on which several zones of sanguine red hues are apparent. This principle was put into work by Dare (1900), when he described the hemoglobinometer that bears his name.

To the best of our knowledge the first experimental work stressing the practical meaning of the apparatus we have used was that of Senty (1922). This author compared several hemoglobinometers, taking as a standard the Cohen & Smith acid hematine method, and reached the conclusion that Dare's instrument is quite effective in ascertaining the hemoglobine rate between 20% and 65%.

The apparatus, as one may see in the photograph (Plate 2 . consists of three pieces, duly adjusted when it is put to work:

a) a handle containing the lighting apparatus;

b) the main part of the instrument containing:

1) a glass blade, red in color, the thickness of which is progressively increasing; on the edge there is a percentual graduation and on the back face a scale in grams;

2) a system of prisms for adjusting the images on the observation area;

c) the « automatic pipette » formed by two glass blades, one transparent and the other opaque, contained inside a metal system of bearing by a screw that unites those blades at one end, while at the other end they are 180 micra apart.

The apparatus is delivered together with a hand perforator and a simple system of candle illumination, in case the electric battery is out of use.

The development of Dare's hemoglobinometer, since its initial description, has been rather unimportant. Haughwont (1929) called the attention of the manufacturers to the advantage of controlling the capillar skylight to which a definite standard must be ascertained. Haughwont observed a difference of 52 micra in the thickness of two pipettes leading to a deviation of 24% in hemoglobin dosage. Further improvements have been made in parts of the apparatus. For instance, the electrifying of the lighting system, the standardization by the Van Slyke method (100% equal to 16 grams hemoglobin), and the fitting of the prism for the purpose of adjusting images on the observation area. Perhaps the most significant improvement was proposed by Sandford (Mayo clinic), consisting in making the standard prism 15% thinner in its upper portion, « a device that decidedly improved the instrument », according to Senty.

In accordance with Van Slyke's volumetric method, we have performed our work without any previous standardization of the apparatus. The results we arrived at were lower than what is commonly found in

the average man. We then standardized the apparatus according to the method recommended by Heilmeyer (1933) Pulfrich's spectrograph - thus getting results closer to the classical level of hemoglobin in man. Heilmeyer's method had been previously standardized by the dosage of iron in the blood (Wong's method, 1928). Therefore the latter was taken as a standard. The results obtained are represented in the following chart.

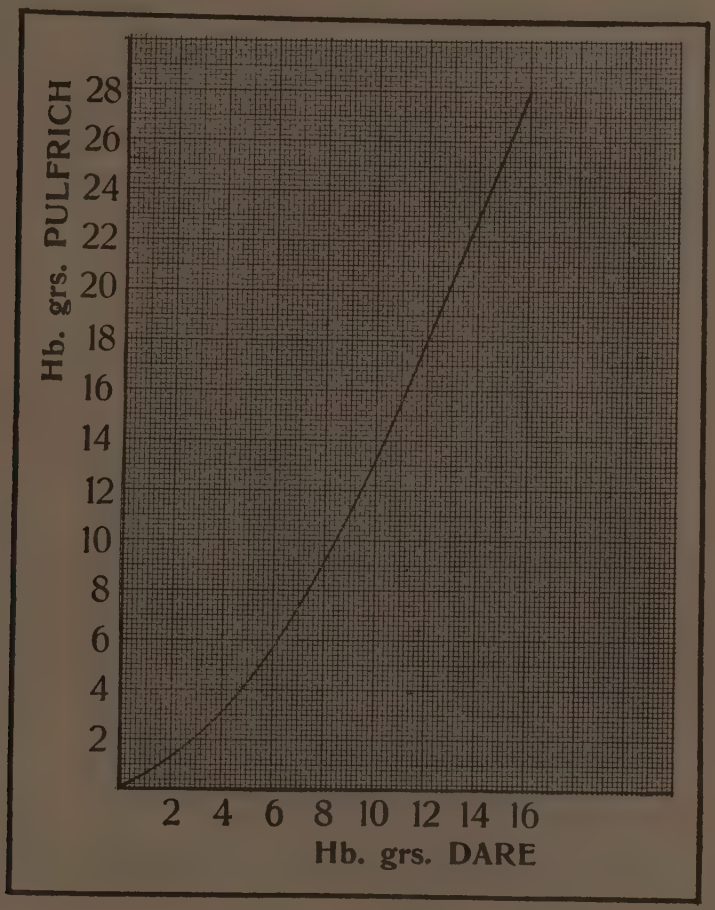


Chart 1

The error limit of the apparatus has been determined with the greatest care. It is impossible to read with the same easiness on the different portions of the prism: under 20% the standard color is increasingly different from that of the anemic blood and under 15% the reading is almost impossible. The reading is confortable, quick and easy between 60% and 20%. From 60% upwards it becomes again different portions of the prisms: under 20% the standard color is inwe wish to attain a reasonable precision. Even then many successive readings must be made.

The error of measure was determined in 20 samples of blood, totalling 200 careful observations. The approximate result was 5% as the relative error. Of course the apparatus we have used is not one of high precision; nevertheless, this limit of error is quite fair for a statistical work of this kind.

Table 1

Measure error of Dare's Hemoglobinometer

N. of samples	DETERMINATIONS										MEAN	Absolute Error	Relative Error (o/o)
1	23	24	23	26	26	25	23	26	27	25	24,8	1,8	7,3
2	71	68	74	66	77	72	73	75	75	73	72,4	4,6	6,4
3	40	38	41	40	41	40	42	41	40	40	40,3	2,3	5,4
4	89	88	92	89	92	92	90	89	90	91	90,2	2,2	2,5
5	27	27	30	30	28	29	30	29	29	30	28,9	1,9	6,6
6	34	35	36	35	38	36	37	38	36	36	36,1	1,9	5,3
7	42	43	44	44	44	44	47	45	45	45	44,3	2,7	6,1
8	28	29	30	29	28	27	27	29	27	28	28,2	1,8	6,4
9	32	33	34	33	35	31	33	33	33	32	32,9	2,1	6,4
10	32	32	34	34	34	33	34	35	35	35	33,8	1,2	3,6
11	31	29	31	31	32	31	31	32	31	32	31,1	2,1	6,8
12	55	55	56	58	55	58	56	55	56	58	56,2	1,8	3,2
13	54	56	60	60	59	55	58	57	60	57	57,9	3,9	6,8
14	102	103	100	97	100	98	99	101	100	100	100,0	3,0	3,0
15	98	99	99	101	99	102	100	101	99	99	99,7	1,7	1,7
16	64	64	64	65	65	62	64	66	64	65	64,3	2,3	3,6
17	81	80	76	77	82	78	75	76	78	80	78,3	3,7	4,7
18	77	75	73	76	73	72	74	72	75	71	73,8	3,2	4,3
19	64	63	64	67	65	64	65	64	67	65	64,8	2,2	3,4
20	61	64	61	62	63	64	62	63	64	63	62,7	1,7	2,7
Mean	200 verifications in 20 samples										51,5	2,4	4,8 o/o

After some 3.000 observations, the following modifications of practical importance have been found of advantage:

1) in dealing with a great number of observations, most of the time is wasted in cleaning the automatic pipettes. Therefore, we deem it indispensable to have at least three of them with their bearings;

2) the difficulty of reading on the extreme parts of the blade, as we have pointed out before, might be easily overcome if pipettes of different thickness were used. Three pipettes would be enough: one with the thickness of the common pipettes usually presented in trade, for the 20%-60% dosage; a second pipette with double thickness intended for easy reading of anemic blood, under 20%; finally, pipettes having half the thickness of the first one described, to be used in connection with blood very rich in hemoglobin. To attain this aim it would be enough to make the opaque glass blade of this automatic pipette in three different thicknesses, at the surface of contact with the transparent blade. The final result would be obtained by multiplying the direct reading by the characteristic coefficient of each thickness.

The ratio of the different thicknesses is in accordance with the following curve, drawn by the method of the *minimum quadratic*, and has been the result of 34 careful observations.

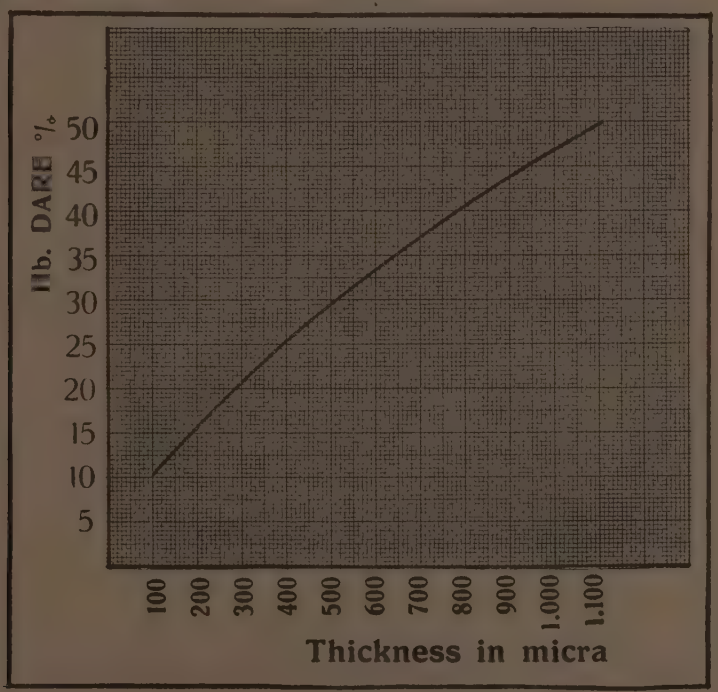


Chart 2

3) For field or even hospital work, when the portability of the instrument must be enhanced, it would be useful to adapt a metal strap at the upper part of the handle. Thus a bandoleer belt might be used and the apparatus could be taken across one's shoulder. In this case it seems desirable that the mortise of the handle be substituted by screws, in order to fix those two parts of the apparatus.

4) It would be of the utmost convenience to insert the diaphragm between the lamp and the automatic pipette, so that the excessive light of brand new electric batteries might be reduced.

5) The most of quickness and easiness in reading would be attained if it became possible to substitute the lens by a photoelectric system of reading.

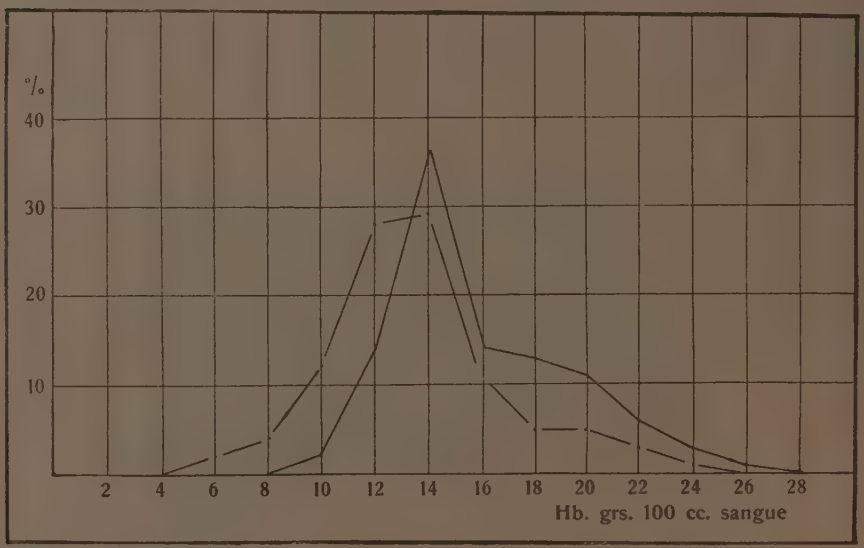


Chart 4 — The full line represents statistical work on 1051 cases of individuals of higher economical condition. The interrupted line, 1144 individuals of lower economical condition. The greater hemoglobin wealth displayed by the economically higher class is evident.

INTERPRETATION AND DISCUSSION

Interpretation of statistical results:

The numerical results displayed on the general table (page 270-271) and in the chart 3 (page 270-271) give but little margin to interpretation: they are conclusive in themselves.

Mean: — The difference of 2,44 grams of hemoglobine in 100 c.c. of blood between the means of the groups under observation is a sure signal that hemoglobin quantity is remarkable influenced by general conditions of the life of the individual in the Northeastern region.

Standard deviation: — This dispersion measure is practically equal in both groups, showing that the deficient condition observed among the individuals of the lower economical class appears evenly in the whole group without any special attraction to people commonly having a poor hemoglobin rate. Chart n. 4 shows very clearly a mere translation of the curve to the left without altering its dispersion. This fact means of course that the cause of hematic scarcity attains indifferently all individuals.

Median and mode: — Both of them distinctly lowered in the economically inferior groups. The chart displays very clearly the distribution of the mode: in group *A*, of higher economical condition, the mode lies on 14 grs. with a sole exception (chart n. 8); in group *B*, of lower economic condition, the mode is at 12 grs., or strongly inclined toward that point.

Variation coefficient: — Generally higher in group *B*, where, in 50% of the cases, it is higher than the highest coefficient observed in group *A* (23,5).

Asymmetry coefficient: — Generally higher in group *A*, where in 65% of the cases it is higher than the highest coefficient observed in group *B* (0,64).

Frequency distribution: — In the upper classes (24 to 26 grs.), frequency is almost null in group *B*, whereas in group *A* it is null in class 6, rare in class 8, and in group *B* it is rarely absent in classes 6 and 8. The central classes 10 and 12 are the most characteristic and they are enough for the purpose of classifying individuals into one of the two groups, *A* or *B*.

In no case a percentage higher than 5% in the 10 grs. class was observed in group *A*. In group *B* only two cases were observed with less than 5% in the 10 grs. class. (As we shall notice, these two classes might be considered half-ways between the main groups *A* and *B*).

In group *A* only two cases were observed with more than 19% in class 12 and in group *B* a single case was recorded with less than 19% in that same class.

Let us bear in mind that the data we are referring to were taken from 22 communities. In this connection we look upon them as indications rather than characteristics. Typical figures, standing as sure

parting limits, may only be obtained when a far greater number of communities be considered, in future investigations. The following figures may be taken, in a provisional condition, as characteristics of each group:

Table 2

	Mean	Variation Coef.	Asimetry Coef.	FREQUENCY	
				Class 10	Class 12
Group A	+ 15 grs.	— 25 °/o	+ 0,70 (65 °/o of the cases)	— 5 °/o	— 19 °/o (80 °/o of the cases)
Group B	— 15 grs.	+ 25 °/o (50 °/o of the cases)	— 0,70	+ 5 °/o	+ 19 °/o

PECULIAR CASES:

Using the method of the present work, a fair result was arrived at Fortaleza, when we investigated the hematic condition of local fishermen. Fish, their chief food, is acknowledged to be a very poor nourishment as far as hematic values are concerned. It is a well-known fact that fish plus milk and bread form the basic ration for animals when necessary to keep them experimentally in a low hematic level. Therefore such people have essential importance for any investigation dealing with hematic conditions. A perfunctory inquiry concerning food revealed that meat did not appear in their diets. It even came to our knowledge that serious intoxications in several instances ensued the breaking of the regimen. The fact is easy to understand if we consider that the fishing profession in our Northeastern zone form an hereditary professional nucleus. Little children go to the sea very early, helping their fathers in the fishing rafts, and food is always fish, since early childhood.

The result of the examination carried on was opposed to anything we might expect: a normal distribution of the hemoglobin curve with one of the highest means (16 grs.). But a new and more accurate investigation about the alimentary habits of those people brought a thorough explanation: all of them are very fond of eating the liver of a fish they call Cangulo (Monacanthideum sclerodermi). Such fondness becomes manifest whenever there is a surplus of nourishment: not a small portion of Cangula liver is wasted. Those people live therefore on an alimentary regimen fitting the treatment of pernicious anemia, owing to the facility of getting plenty of Cangulo.

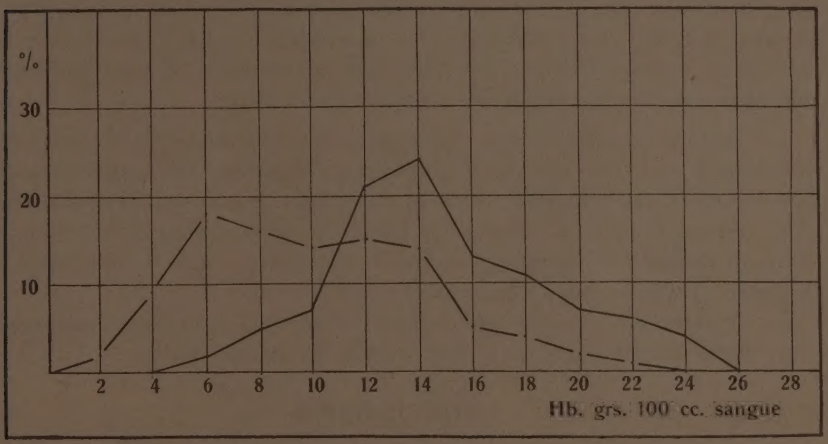


Chart 5 — The full line represents statistical treatment of 130 observations of inhabitants of Russas, a town in the State of Ceará. The interrupted line stands for 100 observations of people living at the rural outskirts of that town. Results were obtained during a serious malaria epidemics. The chart shows a greater incidence of the hematic disturbance on the rural population, of a lower economical condition.

ANCYLOSTOMIASIS ANEMIA:

Our verification confirms the results described by modern authors concerning the occurrence of serious ancylostomiasis anemia, producing the symptoms of the disease. In 1150 observations of well-to-do individuals we did not have a single case of ancylostomiasis anemia; on the other hand in 1300 people of low economic standing we recorded nearly 2% of serious cases of that disease.

A very interesting case was observed, dealing with the quick disappearance, after a simple iron treatment, of the characteristic edema. Anemia was intense — 910.000 red blood cells hemoglobin, approximately 2 grs. — and large edemas might be observed in the limbs and face (see photographs ns. 2 & 3). After a four day treatment with a daily gram of reduced iron the edemas disappeared (see photographs 4 & 5), this result being a thorough confirmation of what we have previously published (Cruz, 1934).

SUMMARY

We have tried to verify in the Brazilian Northeastern zone, in nearly 3.000 observations, the relation between general living conditions

of a particular population and its hemoglobin rate. For the purpose we employed Dare's hemoglominometer, a detailed study of which has been presented together with a few modifications deemed of high importance for future use of the apparatus in specialized work.

A fair correlation was noticed between hemoglobin wealth of the individual and his economic condition, whenever the experiment has been made upon a number of cases allowing rational statistical treatment. The causes of such a correlation have not been searched for; we have only discussed the meaning of the method as a test to determine the hematic conditions of a certain territory.

Incidentally it was again ascertained that ancylostomiasis anemia may only develop among people of low economic status.

CONCLUSIONS

1 — Dare's hemoglobinometer proved to be a practical instrument with sufficient precision to perform statistical quantitative researches of hemoglobin;

2 — In the Northeastern zone of Brazil a fair correlation was established between hemoglobin rate and the economic status of local populations;

3 — The hemoglobin dosage ascertained within an homogeneous group of individuals, as to their general conditions of life, and in sufficient number of cases seems to have a definite meaning as a test, leading to an inquire on the standard of life of this group;

4 — Incidentally it was once more verified that ancylostomiasis anemia only appears among individuals of deficient nutrition, no case having been verified in people of the opposite condition.